UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MÉCANISMES
D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNÉE 1972-1973

*Série E. N° 269*

# THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

**Jean-Paul BOGAERT**

---

*TITRE DE LA THÈSE :*

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE ET DE DIVERS AUTRES ACIDES ORGANIQUES ASSOCIÉS DANS L'ARTICHAUT *(Cyrana scolymus L.)*

---

Soutenue le 18 OCT. 1973 , devant la commission d'examen

---

*Membres du Jury :*

*Président* : M. P. DELAVEAU
*Examinateurs* : MM. R. PARIS
J.-M. PELT
J.-M. JOUANY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543921_0161

OUDART & CLÉMENT
RELIEURS
11, Rue Sainte-Anne, 11
Tél. 52.80.09 - NANCY

UNIVERSITÉ RENE DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MÉCANISMES
D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNÉE 1972-1973

*Série E. N° 269*

# THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MÉCANISMES D'ACTION
DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

**Jean-Paul BOGAERT**

---

*TITRE DE LA THÈSE :*

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE
ET DE DIVERS AUTRES ACIDES ORGANIQUES ASSOCIÉS
DANS L'ARTICHAUT** *(Cyrana scolymus L.)*

---

Soutenue le 18 OCT. 1973 , devant la commission d'examen

---

*Membres du Jury :*

*Président* : M. P. DELAVEAU
*Examinateurs* : MM. R. PARIS
J.-M. PELT
J.-M. JOUANY

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION

I - Rappel historique 2

II - Emploi de l'Artichaut en thérapeutique 2

PREMIERE PARTIE : LES PRINCIPES AMERS, EN PARTICULIER LA CYNAROPICRINE, CHIMIE ET PHARMACOLOGIE 10

CHAPITRE I : MISE AU POINT DES TRAVAUX ANTERIEURS 10

A - Isolement et structure chimique 10

B - Propriétés pharmacologiques 14

CHAPITRE II : RECHERCHES PERSONNELLES 14

A - Isolement et étude analytique 14

1) Extraction 14
2) Purification de la cynaropicrine brute 16
3) Analyse des fractions 17

B - Propriétés pharmacologiques 18

1) Action vis-à-vis du foie 18

a) Effet cholérètique 19
b) Effet amphocholérètique 19
c) Conclusion 22

2) Action vis-à-vis du rein 23

a) Protocole expérimental 23
b) Résultats 25

3) Conclusions 25

DEUXIEME PARTIE : NOUVELLE EXPLORATION CHIMIQUE DE L'ARTICHAUT 28

CHAPITRE I : L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE DE SYNTHESE ET SES PROPRIETES 28

A - Préparation de l'acide hydroxyméthylacrylique par synthèse 28

1) Méthode de synthèse 28
2) Analyse du produit obtenu 28

B - Caractères analytiques 29

1) Réactions colorées 29
2) Identification par chromatographie en couche mince 31

a) Analyse de l'acide hydroxyméthylacrylique non transformé 31
b) Analyse de l'acide hydroxyméthylacrylique transformé en son dérivé d'addition mercuriel 36

3) Caractérisation et dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique par chromatographie en phase vapeur 38

a) Caractérisation 38
b) Dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique 44

CHAPITRE II : PREPARATION DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE A PARTIR DE LA CYNAROPICRINE ET IDENTIFICATION 48

A - Mise au point d'une méthode d'hydrolyse 48

1) Hydrolyse en milieu alcalin 48
2) Hydrolyse en milieu acide 48
3) Etude analytique des produits d'analyse 49

a) Réactions colorées 49
b) Chromatographie en couche mince 50
c) Chromatographie en phase vapeur 52

4) Conclusions 56

B - Application du dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique au dosage indirect de la cynaropicrine 59

1) Mode opératoire 59
2) Résultats 60
3) Discussion 62

CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE SOUS SES DIVERSES FORMES DANS L'ARTICHAUT 64

A - Recherche d'une méthode d'extraction 64

1) Historique 64
2) Méthode d'extraction par l'eau en milieu neutre 65

a) Technique 65
b) Caractères analytiques de l'extrait obtenu 66

3) Extraction par le méthanol légèrement acide 69

a) Technique 69
b) Résultats 69
c) Vérification de la valeur des méthodes utilisées par application à la cynaropicrine 70
d) Conclusion 71

B - Isolement des acides organiques après hydrolyse acide ou alcaline 72

1) Techniques 72
2) Caractères analytiques des extraits obtenus 73
3) Conclusions 75

CHAPITRE IV : LES AUTRES ACIDES ORGANIQUES DE L'ARTICHAUT 77

A - Caractères analytiques des extraits 77

1) Réactions colorées 77

a) Réactions de DENIGES 77
b) Réactions au gaïacol sulfurique 78

2) Fractionnement des extraits par les sels de plomb 79
3) Chromatographie sur colonne 82

a) Historique 82
b) Mode opératoire 82
c) Résultats 84
d) Conclusion 84

4) Séparation des acides organiques par chromatographie sur couche mince 87

a) Chromatographie des composés dans le solvant acide 87
b) Chromatographie des composés dans les solvants alcalins 95

5) Chromatographie en phase vapeur 100

a) Préparation et chromatographie des acides témoins 100
b) Préparation et analyse des échantillons d'Artichaut 107

B - Dosage des acides organiques contenus dans les extraits d'Artichaut obtenus après hydrolyses acide et alcaline de la plante 109

1) Chromatographie en phase vapeur 109

a) Conditions opératoires 109
b) Résultats 111
c) Conclusions 115

2) Dosages enzymatiques 116

a) Conditions opératoires 116
b) Résultats 127

3) Conclusions 127

C - Hypothèse sur l'origine et l'accumulation des acides organiques 130

1) L'origine de l'acide hydroxyméthylacrylique 130
2) Les processus d'accumulation des autres acides 132

TROISIEME PARTIE : ACTIVITES BIOLOGIQUES DU BLOC ACIDE ET EN PARTICULIER DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE 136

CHAPITRE I : ACTIVITE BIOLOGIQUE, RECHERCHE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA SUCCINYL-DESHYDROGENASE 137

CHAPITRE II : ACTION SUR LES ETRES VIVANTS 140

A - Caractéristiques pharmacologiques de l'acide dicaféyl-1,4 quinique 141

1) Action vis-à-vis du foie 141

a) Effets cholérètiques 141
b) Potentialisation de la fonction antitoxique du foie 144

2) Action sur le métabolisme du cholestérol 144

a) Action sur l'animal dont la cholestérolémie est normale 146
b) Action sur l'animal en hypercholestérolémie 146

3) Action diurétique et action sur le pouvoir de concentration du rein 148

4) Action antibactérienne - antivirale 148

B - Action des acides alcools sur les microorganismes 150

1) Action sur les bactéries 151

a) Technique 151
b) Résultats 152

2) Action sur les levures 152

a) Technique 152
b) Résultats 152

3) Conclusions 153

C - Action des acides alcools sur les animaux supérieurs 154

1) Etude de la toxicité 154

a) Etude de la toxicité aigüe 154
b) Toxicité à moyen terme de l'extrait butanolique d'Artichaut 158

2) Effets vis-à-vis du foie 164

a) Effet cholérètique 164
b) Effets amphocholérètiques 167

3) Effets vis-à-vis du rein 179

a) Modification du débit urinaire 179
b) Bilan ionique urinaire 190

4) Effets protecteurs vis-à-vis de certains toxiques 192

a) Rôle détoxicant vis-à-vis du pentobarbital 193
b) Rôle protecteur vis-à-vis de l'alcool éthylique 198

CHAPITRE III : HYPOTHESE CONCERNANT LES RAPPORTS ENTRE LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES ET LES METABOLISMES CELLULAIRES 203

CONCLUSIONS GENERALES 209

BIBLIOGRAPHIE 222

## AUX MEMBRES DE MON JURY DE THESE

A notre Président de Jury, Monsieur P. DELAVEAU, Professeur de Pharmacognosie à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes à PARIS.

En m'accueillant dans son laboratoire et en me guidant de ses conseils avisés, il m'initia au travail scientifique avec beaucoup de patience et de sollicitude. Sa grande bienveillance à mon égard contribua largement à développer en moi le goût de l'enseignement et de la recherche. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur R. PARIS, Professeur de Matière Médicale à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes, qui a bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail.

Je lui exprime ma vive reconnaissance, pour les encouragements et les conseils qu'il m'a prodigués avec tant de générosité.

A Monsieur J.M. PELT, Professeur de Biologie végétale et de Pharmacognosie à l'Université de METZ, Président de l'Institut Européen d'Ecologie, qui a bien voulu m'ouvrir son laboratoire et m'accueillir durant mon service militaire, me fournissant ainsi les moyens de poursuivre mon travail de recherche.

En me faisant bénéficier de son aide et de sa large expérience, il m'a en toutes circonstances été d'un grand secours. Qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements.

A Monsieur J.M. JOUANY, Maître de conférences de Toxicologie à l'Université de METZ, Directeur scientifique de l'Institut Européen d'Ecologie, qui fut à l'origine de mon sujet de thèse.

C'est à lui notamment que je dois d'avoir été initié aux techniques de la pharmacologie et de la toxicologie. J'ai pu ainsi élargir les perspectives de recherche en bénéficiant en toute circonstances de sa très grande compétence scientifique dans des disciplines diverses, alors nouvelles pour moi. Je tiens à lui exprimer ici mes sentiments de très vive gratitude et le témoignage de toute mon amitié.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une étroite coopération scientifique entre des enseignants et des chercheurs de plusieurs disciplines pharmaceutiques et de plusieurs U.E.R..

C'est en effet, d'un commun accord que Messieurs les professeurs DELAVEAU, JOUANY, PELT nous ont proposé, à mon camarade et ami François MORTIER et à moi-même, ce sujet de recherches sur les principes actifs de l'Artichaut. Depuis lors, notre travail s'est toujours déroulé dans un climat de parfaite collaboration et de profonde estime et amitié réciproque, tant à la Faculté de Pharmacie de PARIS d'abord, qu'à la Faculté de Pharmacie de NANCY, puis à l'Institut Européen d'Ecologie de METZ.

Il avait été convenu initialement que François MORTIER explorait plus spécifiquement le domaine des acides alcools aliphatiques, tandis que de mon côté, je me consacrerais à l'étude des principes amers. Ces deux pistes de recherche devaient finalement converger, grâce à la découverte dans les extraits d'Artichaut d'un nouveau principe actif, l'acide hydroxyméthylacrylique, présent à l'état libre, ou combiné au noyau guaïanolide de la molécule de cynaropicrine, principe amer fondamental du *Cynara scolymus*. Or, cet acide apparut comme l'un des principaux responsables des propriétés pharmacologiques de la plante, lesquelles se manifestent plus fortement encore lorsqu'il est associé à plusieurs autres acides alcools aliphatiques également présents dans les extraits.

Ce travail de groupe, auquel a été également associée pour une large part Madame LORRAIN, Maître Assistant, nous a ainsi permis de déceler les supports de diverses propriétés pharmacologiques constatées dans les extraits, mais non rapportées jusqu'ici à des substances

chimiquement définies, puisqu'aussi bien elles ne pouvaient être imputables à la cynarine.

Ce travail mené en équipe nous a permis d'étendre notre activité à des domaines proches de la matière médicale, tels que la pharmacologie, la toxicologie et d'esquisser quelques hypothèses quant aux mécanismes biochimiques soutendant les effets pharmacologiques constatés

Je tiens à remercier de tout coeur les professeurs et mes camarades de laboratoire qui ont continuellement donné à ce groupe de recherches, malgré l'éloignement géographique, une dynamique et un esprit d'invention scientifique qui ne se sont jamais démentis au cours de nos quatre années d'étroite collaboration.

# INTRODUCTION

## I - RAPPEL HISTORIQUE

L'Artichaut (*Cynara scolymus* L. Composées) paraît avoir fait l'objet d'applications thérapeutiques depuis la plus haute antiquité. Déjà cité par les auteurs anciens STRABON, PLINE, COLUMELLE, il était recommandé par GALIEN, sous forme de décoction de racines dans le vin, pour éliminer les calculs urinaires. Il fut prescrit par AMATUS LUSITANUS au pape JULES II et au grand duc de Toscane COSNE II de Médicis. Plus tard, Pierre-Jean-Baptiste CHOMEL (I76I) recommanda l'emploi d'un extrait d'Artichaut dans l'ictère et l'hydropisie. Les deux actions hépatique et rénale de la plante étaient donc déjà distinguées.

Au 19ème siècle, les propriétés hépatiques et rénales de la plante furent mises à profit en médecine populaire. Selon la célèbre théorie des signatures, l'amertume de l'Artichaut aurait indiqué des propriétés bénéfiques pour le traitement des maladies hépatiques avec troubles de la secrétion de la bile, amère par excellence. L'Artichaut est alors prescrit sous forme d'infusion des feuilles de la tige, de décoction de racines ou de suc frais. C'est à cette époque que GUITTEAU entreprit les premières études chimiques et prépara un <u>extrait hydroalcoolique</u> sec de feuilles ayant la saveur amère et la cassure fibreuse de l'aloès.

Ce n'est cependant qu'en 1930 que BREL attribua les effets diurétiques et cholérètiques d'un extrait hydroalcoolique d'Artichaut à sa richesse en sels organiques, les cations étant surtout le potassium et le magnésium.

En 1934, EDGAR ROSA poursuivant ses études sur l'extrait qu'il avait préparé en 1928, réussit à isoler un corps complexe constitué de

cristaux incolores et polymorphes, de formes variables suivant le solvant de cristallisation. Le produit possède des fonctions acide et alcool. Cependant, l'absence de fonction phénol, distingue ce principe de celui décrit par CHABROL et CHARONNAT l'année précédente.

Le mérite de la découverte d'un principe actif du *Cynara scolymus* revient à PANIZZI et SCARPATI (1954) qui, reprenant les travaux de CHABROL (1931), de RAVINA (1934), puis de TIXIER et de SEZE (1937, 1939), isolèrent sous le nom de Cynarine, l'acide dicaféyl-1,4 quinique. Cette substance se montra douée de propriétés cholérétiques non négligeables, et fut également considérée comme responsable de l'activité diurétique. Les recherches s'orientant alors dans cette voie, SCARPATI et ORIENTE (1957) décèlent plusieurs autres polyphénols parmi lesquels, les acides caféique et caféyl-3 quinique ou acide chlorogénique. En 1964, MICHAUD identifie à côté de l'acide dicaféyl-1,4 quinique l'acide caféyl-5 quinique ou acide néochlorogénique, puis en 1967 signale que l'acide dicaféyl-1,4 quinique est en réalité un artefact de préparation et que le véritable principe primaire de la plante est l'acide dicaféyl-1,3 quinique.

Outre ces dérivés caféiques, l'Artichaut contient des flavonoïdes dérivant du lutéol ou tétra hydroxy-4,5 - 3',4' flavone. On peut citer le cynaroside ou glucosyl-7 lutéol et le scolymoside ou rhamnoglucosyl-7 lutéol (MASQUELIER et MICHAUD, 1956)et (MICHAUD et MASQUELIER, 1957) ainsi que le cynarotrioside (DANIK et CHERNOBAT, 1966) qui est un rhamnoglucosyl-7 glucosyl-4' lutéol.

En dehors des depsides caféiques qui forment un groupe chimique homogène et des flavonoïdes, l'Artichaut renferme encore une sub-

stance amère : la cynaropicrine dont la structure a été élucidée par SUCHY, HEROUT et SORM (1960), ainsi que plusieurs stéroïdes tels que le taraxastérol, le ψ-taraxastérol, le stigmastérol, le β-sitostérol (FRUHSTORFER, 1954). A ces substances stéroïdiques, peut se rattacher une sapogénine dérivée d'un trihydroxystéroïde, la cynarogénine (ATHERINOS, EL-KHOLY, SOLIMAN, 1962).

Il faut enfin mentionner la présence d'acides alcools (BALANSARD, 1951), de tanins et de sucres.

Le tableau n° 1 récapitule l'ensemble des constituants isolés de cette plante.

## II - EMPLOI DE L'ARTICHAUT EN THERAPEUTIQUE

Parmi les plantes à actions cholagogue-cholérétique, l'Artichaut occupe une place de choix avec une consommation en feuilles sèches voisine de 100 tonnes par an (PELT, 1965). Il ne faut pas omettre d'y ajouter la consommation de feuilles fraîches qui s'élève au chiffre incroyablement élevé de 1 500 tonnes par an environ (soit 10 tonnes par jour pendant six mois de l'année). Il semble donc que, malgré une liste sans cesse croissante de produits issus de la chimie de synthèse (tableau n° 2), les cholagogues et cholérétiques restent, par excellence, un domaine où les formes galéniques ont conservé toute leur valeur.

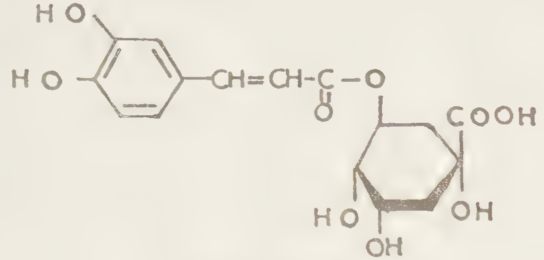
On trouve peut-être l'explication de cet engouement pour une forme thérapeutique ancienne dans le fait qu'un constituant chimique, isolé puis défini, voire refait par synthèse tel que la cynarine, ne représente qu'une partie des propriétés pharmacologiques souvent fort complexes de la plante entière. Il doit donc exister, en particulier

| POLYPHENOLS | | PRINCIPE AMER | STEROIDES | SAPONOSIDES |
|---|---|---|---|---|
| Dérivés caféiques | Flavonoïdes | | | |

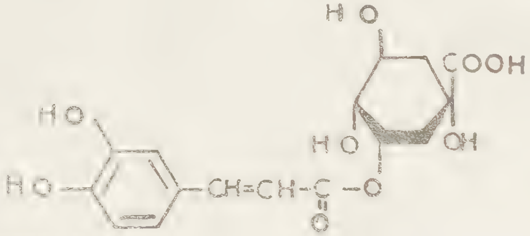
## Dérivés caféiques

Dérivés monocaféyl-quinique

☐ Acide caféyl-3 quinique (acide chlorogénique)

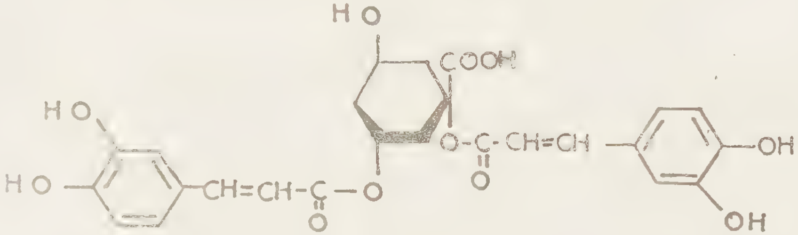


☐ Acide caféyl-5 quinique (acide néochlorogénique)

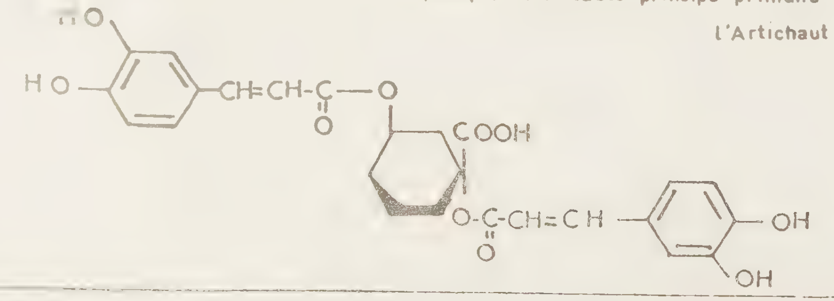


Dérivés dicaféyl-quinique

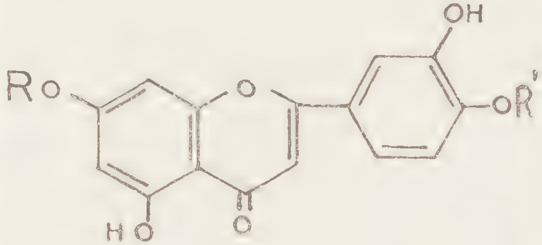
☐ Acide dicaféyl-1,4 quinique (cynarine)



☐ Acide dicaféyl-1,3 quinique (véritable principe primaire de l'Artichaut)



## Flavonoïdes



| | R | R' |
|---|---|---|
| lutéol | H | H |
| cynaroside | glucose | H |
| scolymoside | glucose + rhamnose | H |
| cynarotrioside | glucose + rhamnose | glucose |

## PRINCIPE AMER

cynaropicrine

## STEROIDES

taraxastérol

ψtaraxastérol

stigmastérol

βsitostérol

## SAPONOSIDES

cynarogénine

Tableau n° 1 : Principaux constituants isolés du *Cynara scolymus* L. (Composées)

| DENOMINATIONS COMMUNES | NOMS COMMERCIAUX | POSOLOGIE MOYENNE QUOTIDIENNE |
|---|---|---|
| I - DERIVES DE L'ACIDE BUTYRIQUE | | |
| Acide phényldiméthylacétique | Dig-Bil | 500 - 1 000 mg |
| Cyclohexylbutyrate de bétaïne | Stéa-16 | 500 mg |
| Cyclobutyrate sodique | Hébucol | 750 mg |
| Dihydroxy-dibutyl-éther | Dyskinébyl | 1 500 mg |
| II - DERIVES DE L'ACIDE CINNAMIQUE | | |
| Phénylméthoxycinnamate de magnésium | Bilcrine | 600 mg |
| Cynarine | Cynarine 75, Listrocol | 150 mg |
| Triméthoxychalcone | Vésidryl | 1 500 mg |
| III - DERIVES DES ACIDES CHOLIQUE | | |
| Cholates | Félamine, Opobyl | 250 mg |
| Déshydrocholates | Décholergon, Déchophylline, Dycholium, Euchobyl | 1 000 mg |
| IV - CARBINOLS | | |
| Cyclohexylméthyl propanol | Bilidia | 300 mg |
| Phénylpentanol | Cholipin | 500 mg |
| Pyranyl phényléthanol | Védrénan | 300 mg |
| Tocampyl | Hépatoxane | 600 mg |
| Vanillidène (cyclovalone) | Vanilone, Vanisorbyl | 600 mg |
| Vanitiolide | Bildux | 1 500 mg |
| V - NAPHTOLS | | |
| Acide bromoxynaphtoïque | Pronacol | 450 mg |
| Membutone | Ictéryl | 450 mg |
| Hydroxynaphtoate de magnésium | Régacholyl | 750 mg |
| VI - DIVERS | | |
| Anétholtriphione | Sulfarlem | 50 mg |
| Hymécromone (substance dérivée des ombelliférones naturelles) | Cantabiline | 600 mg |
| Oxaphénamide | Driol | 600 mg |
| Phénylamylate camphorique | Flubilar | 400 mg |

Tableau n° 2 : Principaux produits de synthèse cholagogues - cholérétiques, avec indication des posologies moyennes quotidiennes.

chez les plantes à réputation cholagogue-cholérétique, d'autres principes encore inconnus qui enclenchent alors, associés au constituant chimique principal, des phénomènes de synergie, voire de potentialisation dont il est fréquemment question dans le langage des pharmacognosistes.

Il ne faut pourtant pas négliger que l'isolement d'un composé chimique défini apporte une "concentration" en principe dit actif qui peut-être très importante alors que dans la plante entière les vrais principes actifs sont souvent très dilués dans le matériel végétal.

Le problème semble donc se situer dans un compromis entre l'essai de concentration sans purification excessive qui alors entraînerait la perte sinon l'élimination de substances plus ou moins déterminantes dans le spectre thérapeutique de la plante considérée et l'isolement d'un produit chimique défini à action thérapeutique plus restreinte.

## III - PRINCIPES RESPONSABLES DE L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DE L'ARTICHAUT

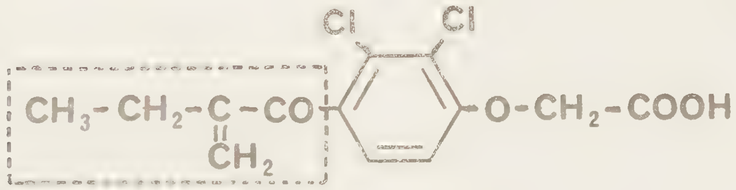
Si tous les auteurs s'accordent à reconnaître à la cynarine des propriétés cholagogues et cholérètiques, peut-on rapporter l'effet diurétique à cette substance seule ou associée aux flavonoïdes présents dans la plante ?

Il est en effet frappant de constater que certains extraits galéniques, tel que l'extrait purifié de *Cynara scolymus* commercialisé sous le nom de Chophytol*, se révèle actif dans les néphrites chroniques et l'oligurie des cardiaques et des cirrhotiques bien qu'il ne contienne plus de composés polyphénoliques. On pouvait dès lors se demander si

* Laboratoire ROSA phytopharma

d'autres principes actifs n'intervenaient pas dans l'effet thérapeutique de la drogue. Une nouvelle analyse chimique et pharmacologique de cette Composée s'imposait donc, travail que nous avons entrepris, sans sous-estimer au départ l'ambition et les risques d'une telle tâche, la chimie de cette plante étant particulièrement délicate; car il convenait de tenter d'isoler, puis de caractériser d'autres principes, connus ou inconnus, et de vérifier leur action pharmacologique.

Notre attention a dès l'abord été attirée par le principe amer qui depuis le début soutenait la réputation hépatique de la plante. Cette molécule, la cynaropicrine, possède une chaine latérale de nature acrylique de même que l'acide éthacrynique* (dichloro-2,3 (méthylène-2 butyryl) -4 phénoxy-1 acétique) réputé comme puissant diurétique. Cet acide possède également une activité cholérétique (CAMPESE et SIROBRIGIANI, 1970).




Il nous a donc paru logique d'examiner en priorité les propriétés pharmacologiques éventuelles des principes amers et en particulier de la cynaropicrine, puis de sa chaine latérale l'acide hydroxyméthyl-acrylique et enfin d'explorer les propriétés du bloc acide contenu par la plante.

*Marque déposée : Edécrine ; commercialisée par les laboratoires MERCK SCHARP et DOHME.

## PREMIERE PARTIE

# LES PRINCIPES AMERS,

# EN PARTICULIER LA CYNAROPICRINE

## CHIMIE ET PHARMACOLOGIE

# CHAPITRE I : MISE AU POINT DES TRAVAUX ANTERIEURS

## A - Isolement et structure chimique

C'est en étudiant le résidu d'évaporation d'une solution chloroformique provenant de l'épuisement d'une teinture alcoolique de feuilles d'Artichaut préalablement privée des substances parasites par extraction à l'éther de pétrole, puis au benzène, que SUCHY, HEROUT et SORM (1960), purent déterminer la structure de la cynaropicrine, principe amer du *Cynara scolymus*.

Par passage sur colonne d'alumine neutre, ce résidu, de couleur brun jaunâtre, d'une saveur amère très intense, peut être séparé en plusieurs fractions ne pouvant cristalliser et ne devenant que partiellement solubles dans le chloroforme solvant d'extraction, cette particularité étant imputable à une forte tendance du principe amer à se polymériser. Il a été cependant possible, par étude du spectre infra-rouge des fractions isolées, d'établir que la cynaropicrine possédait au moins une fonction lactone (1774 $cm^{-1}$), et une fonction carbonyle (1740 $cm^{-1}$).

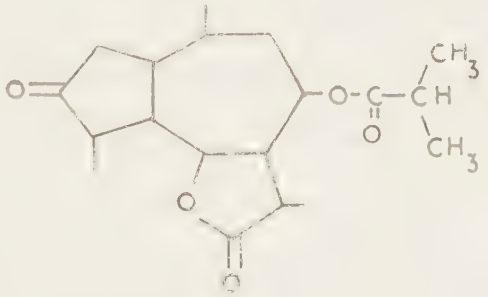
Pour éviter les inconvénients d'une telle polymérisation, la structure chimique de la cynaropicrine fut établie en étudiant ses dérivés d'hydrogénation. Par hydrogénation en présence d'oxyde de platine au sein du méthanol, plusieurs produits cristallisés sont obtenus qui peuvent être séparés par passage sur colonne d'alumine neutre.

Le premier d'entre eux est un composé à fonctions cétone et ester, de formule $C_{19}H_{28}O_5$ (I). Par déshydrogénation en présence de sélénium, il conduit à un mélange d'artemazulène (II) et de lindemazulène

(III) caractérisés par chromatographie sur papier. La présence d'Artemazulène permet d'affirmer que le cycle lactonique est fermé sur le carbone 6 ; celle de linderazulène montre la présence d'un hydroxyle en 8. En outre, cette même cétone-ester traitée par la méthode de WITTING (1954) conduit à un dérivé méthylénique (IV) qui n'a pas été isolé, mais dont la déshydrogénation mène au triméthyl-éthyl-azulène ou méthyl-chamazulène (V). Le groupe cétonique de la cétone-ester est donc fixé sur le carbone 3 du cycle pentagonal.

Dans les produits d'hydrogénation, outre la cétone-ester, on peut isoler un second produit ayant pour formule $C_{19}H_{30}O_5$ (VI). Son spectre infra-rouge montre la présence d'une fonction lactone et d'une fonction ester. Hydrolysé par la potasse alcoolique, il donne un acide en $C_4$, identifié par chromatographie sur papier à l'acide isobutyrique (VII). Cet hydroxy-ester peut être hydrogéné plus complétement par l'hydrure de lithium et d'aluminium en présence d'éther qui transforme alors la fonction lactone en fonction lactol (VIII). Après déhydrogénation par le sélénium à 300°C, on peut donc caractériser l'Artemazulène (IX).

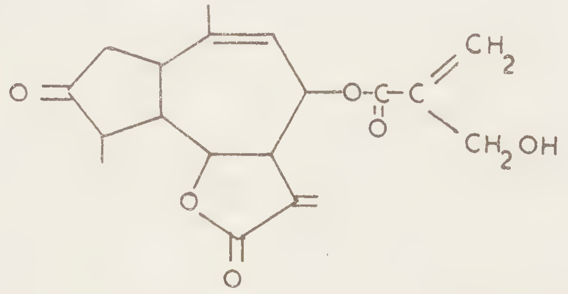
L'ensemble de ces considérations permet d'attribuer à la cynaropicrine la formule partielle suivante dans laquelle la position des oxydryles et des doubles liaisons reste indéterminée :




Dans une seconde étape, les auteurs purent lever ces dernières incertitudes (SUCHY, HEROUT, SORM, 1960). Ce travail fut mené sur le

composé obtenu par hydrolyse de la cynaropicrine non hydrogénée. Outre la détermination de la position des doubles liaisons du cycle , il fut possible d'identifier un nouvel acide non volatil , l'acide hydroxyméthylacrylique. On comprend dès lors que ce soit l'acide isobutyrique qui ait été isolé après hydrogénation poussée de la cynaropicrine.

En définitive, la formule du principe amer serait la suivante :



L'ensemble des dégradations successives et des produits obtenus est collationné dans le tableau n° 3.

La formule de la cynaropicrine a été cependant récemment révisée par SAMEK, HOLUB, DROZDZ, JOMMI, CORBELLA, GARIBOLDI (1971) qui proposent une structure dans laquelle la conformation sur les carbones $C_3$ et $C_8$ a été précisée par CORBELLA, GARIBOLDI, JOMMI, SAMECK, HOLUB, DROZDZ et BLOSZYK (1972).

Mais la complexité de l'Artichaut est bien mise en évidence car ces mêmes auteurs signalent également la présence dans les feuilles fraîches d'Artichaut, à côté de la cynaropicrine, d'un deuxième principe amer, variable suivant l'origine géographique de la plante. C'est ainsi qu'étudiant des feuilles fraîches d'Artichaut d'origine italienne et polonaise, ils isolent dans le premier cas la grosheimine et dans le deuxième cas la déshydrocynaropicrine. Quant aux feuilles ayant subies une fermentation de 6 jours, elles ne renferment qu'un guaianolide iden-

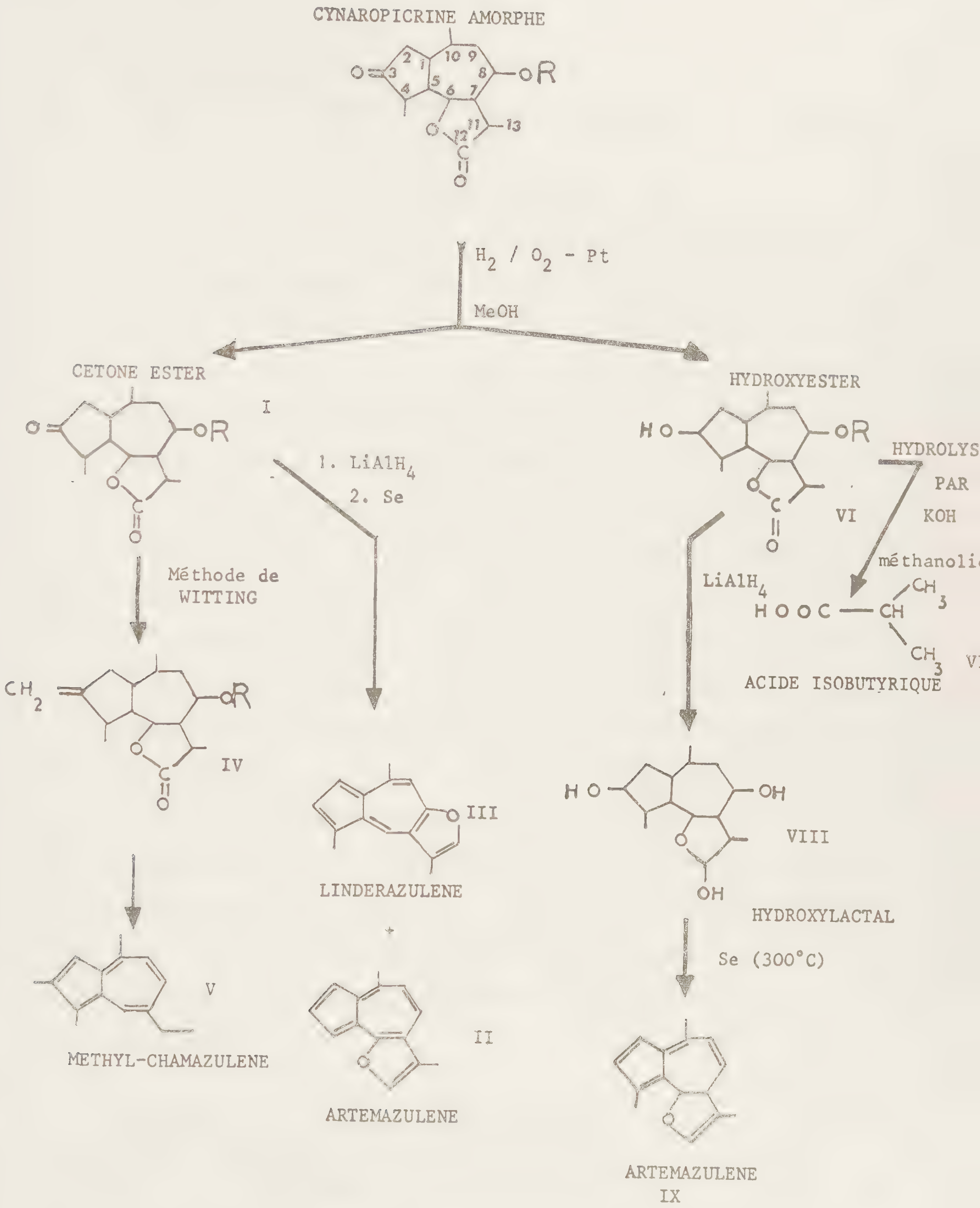



Tableau n° 3 : Principes des dégradations successives permettant d'établir la structure chimique de la cynaropicrine

tifié à l'isoamberboine (GONZALES, MARRERO, BRETON, 1970) (tableau n°4).

B- Propriétés pharmacologiques

Il a été attribué, dès l'antiquité, à un grand nombre de plantes amères, des propriétés pharmacologiques. C'est ainsi qu'en médecine empirique amertume est souvent synonyme d'activité. L'action fébrifuge attribuée à *Erythrea centaurium*, et *Menyanthes trifoliata* (Gentianacées), l'action antibactérienne de la plumérine des *Plumeria*, et de la genipine du *Genipa americana*, l'action purgative du Concombre sauvage, l'action mitoclasique de la podophyllotoxine et des cucurbitacines, nous montrent combien le champ d'action des principes amers est diversifié (BEZANGER-BEAUQUESNE, 1967).

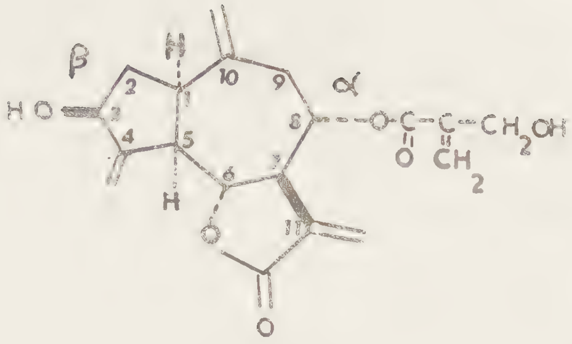
Il est toutefois à noter que les vertus apéritives semblent la propriété la plus courante des amers. Leur utilisation quotidienne à ce titre dépasse largement en ampleur la prescription médicale. Dénuée d'astringence et pratiquement de toxicité, la Gentiane est le plus parfait "amer" utilisé à ce titre. Il semble en être de même de la préparation apéritive d'Artichaut commercialisée sous le nom "Cynar". Par contre, aucune autre propriété pharmacologique n'a, à notre connaissance, été signalée pour la cynaropicrine. Peut-on envisager, pour cette molécule, des propriétés cholagogues et cholérètiques, effets d'ailleurs qui permettraient de vérifier la théorie des signatures? C'est ce point que nous tenterons de préciser.

## CHAPITRE II : RECHERCHES PERSONNELLES

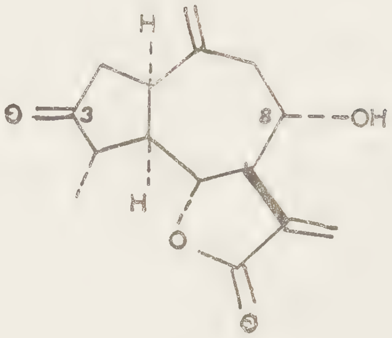
A- Isolement et étude analytique

1) Extraction

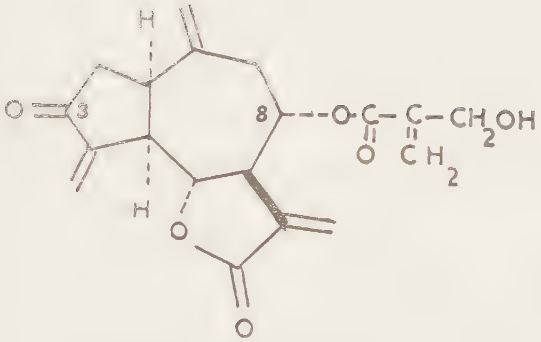
Nous avons mis au point un protocole opératoire s'inspirant de



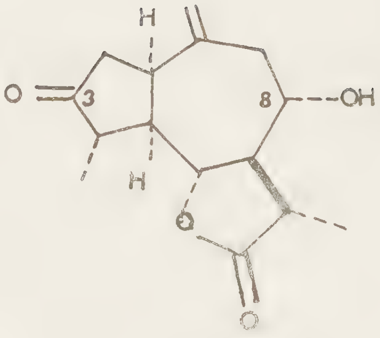
Cynaropicrine



Grosheimine



Déshydrocynaropicrine



Isoamberboïne

Tableau n° 4 : Différents principes amers rencontrés dans les Artichauts de diverses origines

SUCHY, SORM et HEROUT (1960) :

100 grammes de feuilles sèches d'Artichaut sont épuisées successivement dans un appareil de Soxhlet par l'ether de pétrole, le benzène et l'alcool éthylique à 80°. L'extrait alcoolique, qui contient le principe amer est ensuite concentré sous pression réduite jusqu'à obtention d'un volume final de 50 $cm^3$. Après dilution avec un égal volume d'eau distillée, le principe amer est extrait par le chloroforme jusqu'à ce que le résidu sec d'un dernier extrait chloroformique ne donne plus la réaction d'ASAHINA et YODA (1936) applicable à la cynaropicrine (coloration bleue par addition de quelques gouttes d'eau à 1 mg de cynaropicrine dissoute dans 3 gouttes d'acide sulfurique concentré). Les solutions chloroformiques réunies, déshydratées sur sulfate de sodium anhydre, sont finalement concentrées sous pression réduite à température inférieure à 30°C.

Une partie aliquote de cet extrait chloroformique, évaporé à sec, laisse un résidu brun jaune, d'une amertume très intense. Il constitue la cynaropicrine brute.

Remarque : Bien que la réaction d'ASAHINA et YODA ne puisse s'appliquer à la solution aqueuse résiduelle, le rendement d'extraction semble satisfaisant. En effet, il suffit d'ajouter quelques mg de cynaropicrine brute à cette solution aqueuse pour retrouver dans l'extrait chloroformique correspondant une réaction d'ASAHINA et YODA positive.

2) Purification de la cynaropicrine brute

La cynaropicrine brute (500 mg) est purifiée sur colonne d'alumine neutre (60 g). L'élution du principe amer est réalisée au moyen de

mélanges benzène-chloroforme en proportions variables. L'effluent est recueilli par fractions de 10 $cm^3$ selon le schéma suivant :

| Solvants : | Fractions : |
|---|---|
| benzène | 1 - 15 |
| benzène-chloroforme (90-10,V/V) | 16 - 25 |
| Benzène-chloroforme (80-20,V/V) | 26 - 36 |
| Benzène-chloroforme (50-50,V/V) | 37 - 42 |

3) Analyse des fractions

Chaque fraction est analysée par chromatographie sur couche mince.

. Matériel

- Plaques de verre de 0,20 x 0,20 cm
- Adsorbant : Kieselgel G MERCK

. Solvant de migration

- Chloroforme-acétone (3-1, V/V)

. Révélateur

- Solution aqueuse d'acide sulfurique à 50 %

Après pulvérisation du réactif sulfurique et léger chauffage à 110°C, une tache violette de Rf = 0,50 apparaît, correspondant à la cynaropicrine. Un chauffage prolongé des plaques permet de déceler les impuretés de chaque fraction.

Les fractions 20-27 qui renferment une partie du principe amer mais contiennent le moins d'impuretés sont réunies et serviront à l'étude

pharmacologique du principe amer.

B - Propriétés pharmacologiques

1) Action vis-à-vis du foie

a) Effet cholérètique

Nous avons recherché l'éventuelle action cholérètique de la cynaropicrine chez le Rat. En effet, avec cet animal, il est possible d'opérer sur un grand nombre d'individus de même souche et de poids sensiblement identique ; d'autre part, son débit biliaire est assez stable et ses modifications sous l'action d'agents chimiques sont assez facilement reproductibles. Ainsi malgré de faibles variations individuelles, nous avons la possibilité de calculer des moyennes représentatives des lots d'animaux mis en expérience.

(1) Protocole expérimental

Des rats mâles de "souche WISTAR", d'un poids compris entre 200 et 250 g, à jeun depuis 18 heures sont anesthésiés à l'uréthane à raison de 1,4 g/kg, par voie intrapéritonéale.

Ils sont alors placés en décubitus dorsal et après cathétérisation du canal cholédoque, la bile est recueillie dans une pipette d'un centimètre cube graduée au 1/100. Les lectures sont faites toutes les 15 minutes à partir du moment où le débit biliaire de base est constant.

Lorsque la cholérèse de base est stable, les animaux répartis en 2 lots reçoivent par voie intraveineuse dans la veine du penis, les

uns une solution isotonique de chlorure de sodium et les autres la préparation à étudier.

Premier lot

On injecte par voie intraveineuse 0,5 $cm^3$ d'un soluté isotonique de chlorure de sodium pour 200 g de rat. Dans ces conditions, la cholérèse de base n'est pas modifiée, la moyenne du débit observée sur 15 animaux étant de 0,13 $\pm$ 0,01 $cm^3$ avant et après injection de chlorure de sodium. Ces résultats témoignent de la remarquable stabilité du flux biliaire de ces animaux.

Deuxième lot

Il reçoit l'extrait de cynaropicrine débarrassée de toutes traces de solvant organique par distillation sous pression réduite. La substance est administrée aux doses respectives de 80 mg/kg ; 100 mg/Kg ; 200 mg/kg et 500 mg/kg.

(2) Résultats

Dans ces conditions expérimentales, aucune variation du débit biliaire de base n'est observée à ces différentes doses. Le principe amer de l'Artichaut n'a donc pas d'activité cholérètique directe, et la théorie des signatures semble bien être prise ici en défaut.

b) Effet amphocholérètique

(1) Définition et protocole expérimental

Une substance ne sera amphocholérètique que si elle répond

aux deux critères suivants définis par BOUCARD et LAUBENHAIMER (1966) :

- Elle ne doit entrainer aucune variation du débit biliaire physiologiquement normal.

- Elle doit par contre, lutter contre toute variation de ce débit, soit en freinant un débit artificiellement élevé, soit en augmentant un débit diminué sous une influence extérieure.

L'absence d'activité cholérètique du principe amer est, comme nous venons de le voir, le premier critère auquel doit répondre toute substance amphocholérètique. Ce fait étant déjà vérifié, puisque la cynaropicrine ne provoque aucune variation du débit biliaire de base, l'éventuelle action amphocholérètique du guaianolide sera testée par rapport à 2 lots d'animaux dont l'un reçoit par voie intraveineuse une solution de déhydrocholate de sodium (hypercholérètique), l'autre une solution d'azoture de sodium (hypocholérètique).

Deux autres lots d'animaux sont mis en expérience. Le premier lot reçoit simultanèment la substance à étudier et une solution de déhydrocholate de sodium ; le deuxième, la substance à étudier et la solution d'azoture de sodium. Les résultats de ces deux lots d'animaux seront comparés aux résultats obtenus avec les lots d'animaux ayant reçus isolèment soit le déhydrocholate de sodium, soit l'azoture de sodium. Il sera ainsi possible de vérifier le deuxième critère de l'amphocholérèse, en utilisant comme précédemment des rats de souche "Wistar".

α. Hypercholérèse provoquée

Deux lots d'animaux, en fistule temporaire, sont répartis de la façon suivante :

□ Premier lot

Il reçoit par voie intraveineuse une solution de déhydrocholate de sodium à raison de 10 mg/kg. Dans ces conditions, le débit de base est modifié par apparition d'une augmentation de la cholérèse, maximale au bout de la 15ème minute suivant l'injection du produit, puis diminuant par la suite pour revenir au débit de base initial au bout de 45 minutes.

Au cours de nos expériences, nous avons choisi la dose de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium (Dycholium), suffisante pour provoquer l'augmentation franche de la cholérèse.

Les moyennes des débits biliaires pendant les 15 premières minutes suivant l'injection du déhydrocholate de sodium sont de : 0,186 $\pm$ 0,005 $cm^3$ (contre 0,13 $\pm$ 0,01 $cm^3$ en cholérèse normale).

□ Deuxième lot

Il reçoit par injection intraveineuse une solution de déhydrocholate de sodium à la dose de 10 mg/kg et la cynaropicrine aux doses de 80 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg et 500 mg/kg.

Il n'apparait, quelle que soit la dose injectée de guaianolide, aucune diminution de l'hypercholérèse par rapport à celle constatée lors de l'injection du déhydrocholate de sodium seul ; les moyennes des débits biliaires étant au bout de la 15ème minute de 0,186 $\pm$ 0,005 $cm^3$.

β. Hypocholérèse provoquée

L'hypocholérèse a été provoquée à la suite de l'injection intraveineuse chez l'animal d'azoture de sodium, que VANLERENBERGUES,

GUERRIN, BAR, BEL (1963) donnent comme inhibiteur de la cytochrome oxydase et des catalases.

Il a été retenu pour notre expérimentation, car il entraîne une diminution du volume biliaire sans modification de certains constituants fondamentaux de la bile (bilirubine et cholestérol).

L'expérimentation a été conduite comme précédemment.

☐ Premier lot

Il reçoit par voie intraveineuse 1 mg/kg d'azoture de sodium.

Le flux biliaire diminue dès le premier quart d'heure ; l'hypocholérèse se poursuit pendant la première heure, se stabilise, puis revient à la normale au bout de trois heures.

Le pourcentage de diminution du débit biliaire après administration d'azoture de sodium est de - 27 %.

☐ Deuxième lot

Les animaux reçoivent une solution d'azoture de sodium (I mg/kg) par voie intraveineuse, puis dix minutes après cette injection, la cynaropicrine aux doses de 80 mg/kg , 100 mg/kg, 200 mg/kg et 500 mg/kg.

Dans ces conditions, quelle que soit la dose du principe amer injecté, la chute du débit biliaire dûe à l'azoture de sodium reste la même. L'administration de l'extrait de cynaropicrine ne s'oppose donc pas chez le rat à la diminution du flux biliaire provoquée par l'injection d'azoture de sodium à la dose de 1 mg/kg.

c) Conclusion

La cynaropicrine, ne pouvant produire ni contrarier

chez l'animal une augmentation ou une diminution du flux biliaire, n'a donc aucune action hépatique de type cholérètique ou amphocholérètique.

N'est-elle pas par contre responsable de l'activité diurétique incontestable des extraits d'Artichaut ?

## 2) Action vis-à-vis du rein

### a) Protocole expérimental

Nous avons travaillé sur le lapin. Lorsque l'anesthésie par injection intrapéritonéale de carbonate d'éthyle à raison de 1,4 g/kg, est réalisée, l'animal est placé en décubitus dorsal. Pour assurer la surcharge hydrique, une solution isotonique de chlorure de sodium à raison de 1 $cm^3$ par minute et par kilo d'animal est perfusée dans la veine jugulaire.

Après laparotomie médiane, les deux uretères sont cathétérisés et les liquides urinaires sont réunis. L'urine totale est collectée dans un godet de 1,5 $cm^3$ de capacité, solidaire d'un axe qui bascule automatiquement lorsque le volume est atteint. Elle est recueillie sur un collecteur de fractions dans des tubes de verre neutre. Ces fractions serviront ultérieurement à la mesure du pH et des dosages des ions sodium, potassium et chlorures.

D'autre part, ce dispositif permet de mesurer aisément le volume de la diurèse. Lorsque le godet collecteur est plein d'urine (1,5 $cm^3$), il se vide et coupe automatiquement le contact d'un stylet inscripteur se déplaçant verticalement de 1 mm par seconde. Le stylet retombe alors sur la ligne de base, de sorte que les mouvements de ce

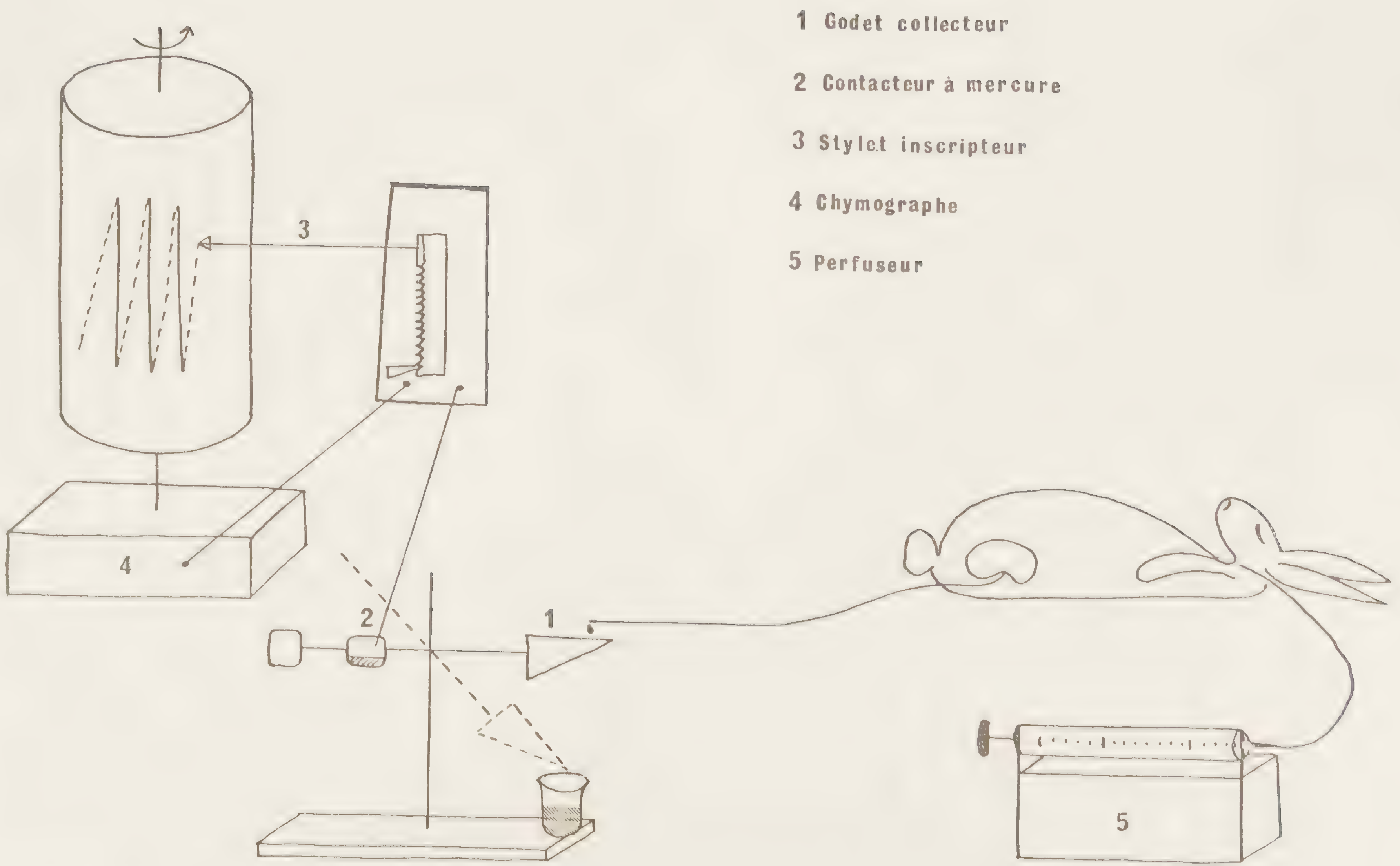



Figure n° I : Schéma de l'appareillage utilisé pour apprécier sur le lapin l'activite diuretique de divers composés.

dernier s'inscrivent sur le tambour noirçi d'un chymographe se déroulant à la vitesse de 4 mm par minute.

L'enregistrement représente des triangles dont la base équivaut au temps mis par le lapin pour uriner 1,5 $cm^3$. Ainsi, plus la surface du triangle est faible, plus l'effet diurétique est intense. Il est donc aisé, sur simple vu d'un diagramme, de suivre l'intensité de l'effet diurétique d'un produit et la durée d'action de celui-ci (figure n° I).

Les animaux ainsi préparés pour l'expérimentation reçoivent par voie intraveineuse dans la veine jugulaire le principe amer en solution aqueuse à des doses de 80 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg et 500 mg/kg.

b) Résultats

Aucune augmentation de la diurèse n'a été observée chez l'animal après injection de la cynaropicrine aux doses indiquées précédemment.

3) Conclusions

Cette molécule, bien que pouvant posséder d'autres actions pharmacologiques, paraît dépourvue de toute action hépatique (flux biliaire) et diurétique. Elle ne peut donc être tenue pour responsable de l'activité hépatorénale qui s'attache à certains extraits de *Cynara scolymus*. Pourtant, comme nous l'avons évoqué précédemment, la structure chimique de la cynaropicrine pouvait nous permettre d'envisager une activité diurétique et cholérètique imputable à sa chaine latérale acrylique. Or il semble qu'il n'en est rien dans le cas de la molécule intacte.

Nous avons alors recherché les actions pharmacologiques de l'acide hydroxyméthylacrylique dont les effets diurétiques et cholérètiques pourraient se manifester soit lorsqu'il est séparé du noyau guaianolide, soit lorsqu'il est présent en partie à l'état libre dans la plante.

Il était donc nécessaire de préparer de l'acide hydroxyméthylacrylique en vue de l'essayer chez l'animal, en l'extrayant de la plante entière puis en le comparant à un acide hydroxyméthylacrylique de référence obtenu par synthèse.

# DEUXIEME PARTIE

# N O U V E L L E  E X P L O R A T I O N  C H I M I Q U E

# D E  L ' A R T I C H A U T

# CHAPITRE I : L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE DE SYNTHESE ET SES PROPRIETES

## A - Préparation de l'acide hydroxyméthylacrylique par synthèse

### 1) Méthode de synthèse

Cette synthèse a été réalisée pour nous par le professeur MOSKOWITZ. L'acide a été obtenu par action du Nickel carbonyle sur l'alcool propargylique en présence d'éthanol et d'acide acétique selon la méthode décrite par ROSENTHAL, SCHWARTZMAN, GRECO et PROPER (1963).

$$4\ HC \equiv C-CH_2OH + Ni(CO)_4 + 4\ H_2O + 2\ CH_3COOH \xrightarrow[C_2H_5OH]{}$$

$$4\ CH_2 = C-(CH_2OH)-COOH + Ni(CH_3COO)_2 + 2\ [H]$$

En fin de réaction, le mélange acidifié à pH = 2,5 par de l'acide chlorhydrique est extrait par l'ether. L'extrait éthéré renfermant l'acide hydroxyméthylacrylique est évaporé, puis l'acide est distillé sous pression réduite (10 mm de Hg) à température voisine de 100°C.

### 2) Analyse du produit obtenu

Le composé a un point d'ébullition de 110°C sous une pression de 10 mm de mercure et son indice de réfraction $n_D^{20}$ est égal à 1,4748. Le poids moléculaire est de 98, déterminé par protométrie, et l'analyse élémentaire fournit les résultats suivants : carbone 47,31 % ; hydrogène 5,76 % ; oxygène 46,93 %. Les valeurs théoriques calculées pour un poids moléculaire de 102 sont les suivantes : carbone 47,06 % ; hydrogène 5,92 % ; oxygène 47,02 %. Les faibles écarts entre les valeurs trouvées et les valeurs calculées, nous permettent d'établir pour le corps synthétisé la formule brute : $C_4H_6O_3$.

Quant à la formule développée, elle a pu être établie grâce aux spectres infra-rouge (UNICAM SP 1200) et de résonnance magnétique nucléaire (VARIAN A 60). Dans ce dernier cas le solvant était du $CDCl_3$, le TMS étant l'étalon interne.

Les valeurs des deux spectres sont réunies dans le tableau n° 5

La seule formule développée correspondant à ces données expérimentales est celle de l'acide hydroxyméthylacrylique : $H_2C = C(CH_2OH) — COOH$

L'acide hydroxyméthylacrylique est très soluble dans le mélange (n-)butanol-acétate d'éthyle (1-1, V/V) ; il peut être extrait entièrement d'une liqueur aqueuse acidifiée à pH 1,5 par trois extractions successives par ce mélange ; la liqueur aqueuse résiduelle ne présente alors plus aucune des réactions du composé.

C'est ce procédé que nous retiendrons pour extraire l'acide hydroxyméthylacrylique des milieux complexes auxquels nous aurons affaire

Nous avons ensuite déterminé les caractères analytiques de l'acide de synthèse sur le plan qualitatif et quantitatif en vue de préciser le comportement de cet acide vis à vis de divers réactifs et d'appliquer ensuite ces méthodes de détermination analytique à l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique de la cynaropicrine naturelle et de l'Artichaut.

## B - Caractères analytiques

### 1) Réactions colorées

. Réaction de BERG (in PESEZ, POIRIER, BARTOS, 1966)

Dans un tube à essais, sont introduites deux gouttes d'une solution méthanolique de l'acide. Après avoir chassé l'alcool par chauffage

SPECTRE INFRA-ROUGE

| | | |
|---|---|---|
| Bandes d'absorption à : | 3 400 $cm^{-1}$ | OH |
| | 3 300 $cm^{-1}$ | |
| | 2 600 $cm^{-1}$ | |
| | 1 705 $cm^{-1}$ | C = O |
| | 1 635 $cm^{-1}$ | C = C |
| | 955 $cm^{-1}$ | |

SPECTRE R.M.N.

| | |
|---|---|
| 4,3 p.p.m. | (2 protons) = b |
| 5,88 p.p.m. | (1 proton ) |
| 6,28 p.p.m. | (1 proton ) = a |
| 7,68 p.p.m. | (2 protons) = c |

(a)

$H_2C = C - COOH$ (C)

$|$

$CH_2OH$

(b) (c)

Tableau n° 5 : Caractéristiques du Spectre Infra-rouge et de résonance magnétique nucléaire de l'acide hydroxyméthylacrylique.

au bain-marie, le résidu repris par quelques gouttes d'eau distillée est additionné d'une goutte d'une solution aqueuse à 0,1 % de chlorure ferrique. Une coloration jaune d'or apparaît aussitôt.

. Réaction d'UFFELMANN (in LEBEAU et COURTOIS, 1936)

Le résidu d'évaporation de deux gouttes de solution méthanolique repris par quelques gouttes d'eau distillée fait virer au jaune une solution violette préparée extemporanément en ajoutant 0,4 g de phénol à 2 gouttes d'une solution officinale de chlorure ferrique préalablement diluée dans 100 $cm^3$ d'eau distillée.

2) Identification par chromatographie en couche mince

Faisant suite à ces deux réactions très générales des acides-alcools, nous avons essayé d'identifier le dérivé acrylique par chromatographie en couche mince d'une solution méthanolique à 1 % de l'acide.

a) Analyse de l'acide hydroxyméthylacrylique non transformé

(1) Conditions opératoires

. Matériel

- Plaque de verre de 0,20 x 0,20 cm
- Adsorbant : Kieselgel G MERCK, épaisseur 25 mm

. Solvants de développement

Après avoir expérimenté plusieurs systèmes de solvants, nous en avons retenu trois.

Les deux premiers (solvants A et B) permettent de chromatographier le composé sous forme de sel d'ammonium, le troisième (solvant C) sous forme acide libre.

. Solvant A

Ethanol - chloroforme - ammoniaque à 25 %
(68-15-17, V/V)

. Solvant B

Ethanol - tétrahydrofuranne - ammoniaque à 25 %
(56-22-22, V/V)

. Solvant C

Toluène - formiate d'éthyle - acide formique
(5-4-1, V/V)

10 µl d'une solution méthanolique à 1 % sont systématiquement déposés sur la plaque. La migration s'effectue à 20°C sur une hauteur de 15 cm. Les plaques sont alors séchées à l'étuve à 60°C, puis révélées.

### (2) Révélateurs

α. Du sel d'ammonium

Les chromatogrammes développés dans les solvants A et B sont révélés à l'aide d'une solution alcoolique à 0,1 % de dichloro-2,6 phénoliodophénol (PASSERA, PEDROTI, FERRARI, 1964), réactif utilisé comme indicateur de pH.

Il apparaît aussitôt une tache rose due à l'alcalinité des sels d'ammonium dont le Rf est respectivement de 0,48 (solvant A) et 0,50 (solvant B).

β. De l'acide proprement dit

Après développement des chromatogrammes dans le solvant C, nous nous sommes adressés en premier à des révélateurs généraux, puis à des révélateurs plus particuliers des acides alcools. Le Rf du composé est également de 0,50 dans ce système de solvant.

. Révélateurs généraux :

- Réactif phosphomolybdique (KRITCHEVSKY et KIRK, 1952)

Solution alcoolique à 5 % d'acide phosphomolybdique.

Pulvériser la plaque et chauffer à l'étuve à 120°C jusqu'à apparition de taches bleues sur fond jaune. Pour augmenter la sensibilité de la réaction, le traitement peut être réitéré deux fois. Ce réactif permet de repérer les composés à fonctions réductrices tel que les fonctions alcools.

- Réactif de SCHWEPPE (1959)

Solution aqueuse à 10 % de glucose - solution alcoolique à 10 % d'aniline -n butanol (1-1-3, V/V).

Pulvériser la plaque et chauffer à 100-110°C pendant 10 minutes environ jusqu'à apparition de taches brunes. Ce révélateur est considéré comme spécifique de la fonction acide.

Pour augmenter grandement la sensibilité du réactif de SCHWEPPE, il nous a semblé préférable d'utiliser un réactif préparé avec une solution d'aniline vieillie artificiellement (oxydée), en ajoutant à celle-ci quelques gouttes de soude concentrée.

Remarque : D'autres révélateurs plus sensibles de la fonction acide peuvent être utilisés tels que le bleu de bromophénol. Cependant, les colorations obtenues sont fugaces.

. Révélateurs particuliers

- Réactif à l'acide chromotropique (BEROZA, 1963)

Ce réactif est constitué par le mélange extemporané de 1 volume d'une solution aqueuse de dihydroxy-1,8 naphtalène-3,6 disulfonate de sodium avec 5 volumes d'une solution aqueuse à 50 % d'acide sulfurique. La plaque, après pulvérisation, est chauffée aux alentours de 100°C pendant 30 minutes. La lecture du chromatogramme sera faite en lumière visible et en U.V. à 366 nm.

Ce réactif est habituellement utilisé pour caractériser les corps oxydables et en particulier les alcaloïdes dérivant du noyau isoquinoléique. Or, nous nous sommes aperçus qu'il donnait une belle coloration brun-orangée avec l'acide hydroxyméthylacrylique.

En se rapportant au mécanisme réactionnel de l'acide malique avec l'acide chromotropique envisagé par PANKOW et ANTERHOFF (1970) qui invoquent une condensation du type PEKMANN, il est possible de proposer pour l'acide hydroxyméthylacrylique le mécanisme détaillé dans le tableau n° 6, conduisant à la formation d'un dérivé coumarinique.

- Réactif à la (p)-nitraniline diazotée (SWAIN, 1953)

Préparation du réactif

S1) (p)-nitraniline - acide chlorhydrique 2N (0,30-100, V/V)

S2) Nitrite de sodium - eau distillée (5-100, P/V)

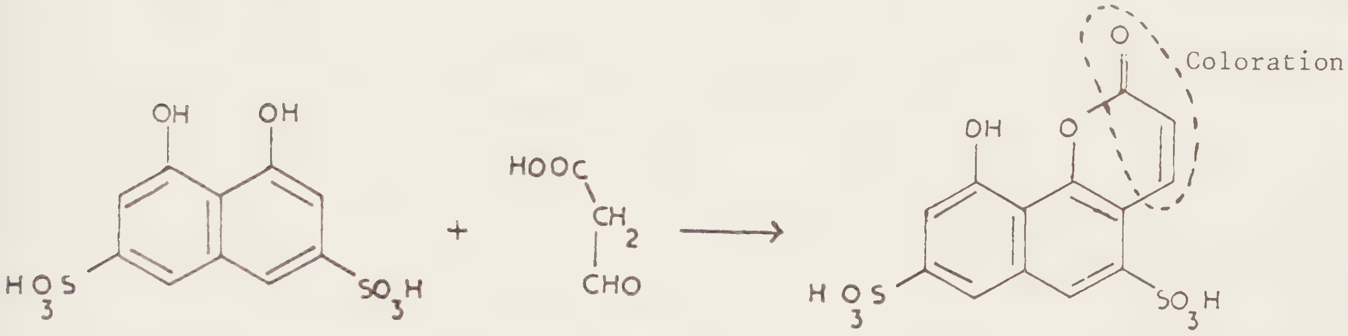
S3) Acétate de sodium - eau distillée ( 20-100, P/V)

S4) Carbonate de sodium - eau distillée (15-100, P/V)

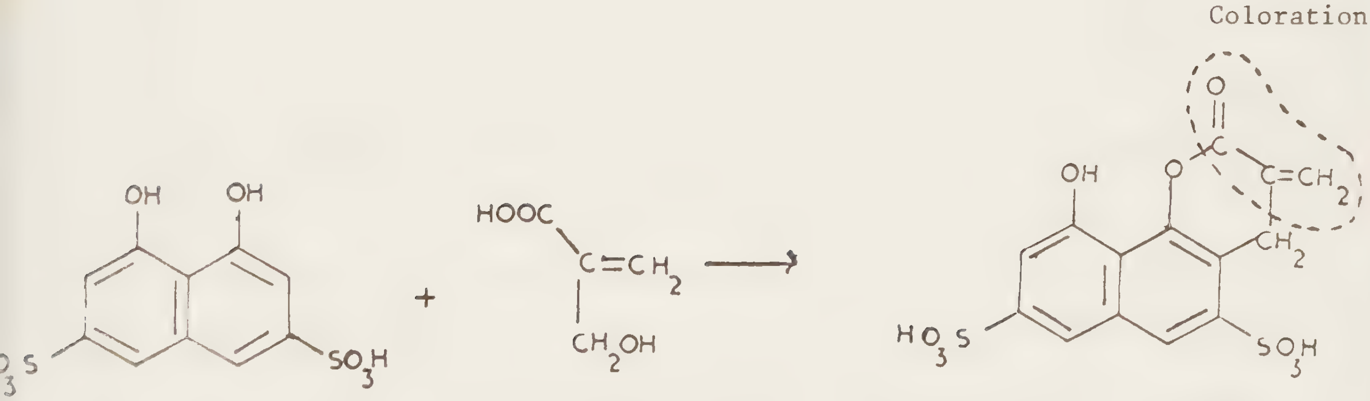
Mélanger extemporanément 2 $cm^3$ de S1, 3 à 5 gouttes de S2 et 8 $cm^3$ de S3. Pulvériser le chromatogramme puis après séchage repulvériser avec S4.

$$HOOC-CH_2-CHOH-COOH \xrightarrow{H_2SO_4} HOOC-CH_2-CHO + (CO + H_2O)$$

Acide malique — Acide formylacétique




Acide chromotropique — Acide formylacétique — Dérivé coumarinique




Acide chromotropique — Acide hydroxyméthylacrylique — Dérivé coumarinique

bleau n° 6 : Mécanisme de condensation possible de l'acide hydroxyméthylacrylique avec l'acide chromotropique par analogie avec celui de l'acide malique réagissant dans les mêmes conditions.

Ce réactif est considéré comme spécifique de la fonction phénol. Or, il donne une coloration rouge orangé avec l'acide hydroxyméthylacrylique. Quelques anomalies de ce type sont cependant signalées dans la littérature, notamment la coloration obtenue, suivant le pH, avec les diènes conjugués (MEYER, 1919).

b) Analyse de l'acide hydroxyméthylacrylique transformé en son dérivé d'addition mercuriel.

(1) Préparation du dérivé mercuriel de l'acide hydroxyméthylacrylique.

La méthode que nous avons utilisée est celle décrite par KIRCHNER (1967).

Le réactif est constitué par une solution d'acétate mercurique à 5,6 % dans l'alcool méthylique contenant 1 $cm^3$ d'eau distillée et 0,4 $cm^3$ d'acide acétique glacial. On laisse à l'obscurité pendant 24 heures le mélange de 25 $cm^3$ de réactif et de 250 mg d'acide hydroxyméthylacrylique témoin ; le méthanol est ensuite évaporé sous pression réduite à 30°C, et le résidu sec est dissous dans 50 $cm^3$ de chloroforme. La solution chloroformique est alors débarrassée de l'excès d'acétate mercurique, soit par 5 lavages avec 25 $cm^3$ d'eau distillée, soit par addition de sulfate d'hydrazine. La solution chloroformique filtrée sur sulfate de sodium anhydre, est ensuite concentrée sous pression réduite à 30°C, puis soumise à la chromatographie sur couche mince.

(2) Chromatographie sur couche mince du composé d'addition

α. Conditions opératoires

. Matériel

- Plaque en verre de 0,20 x 0,20 cm

- Adsorbant : Kieselgel G MERCK, épaisseur 0,25 mm

. Solvants de développement

- Solvant I

Méthyléthylcétone - n propanol - éthanol - ammoniaque à 25 %

(45,5-4,5-18-32, V/V)

Ce solvant s'est avéré être le plus efficace pour la chromatographie des dérivés mercuriels.

- Solvant II

Toluène - Formiate d'éthyle - acide formique

(5-4-1, V/V)

C'est celui que nous avons choisi pour les chromatographies précédentes.

. Substance déposée

- Composé d'addition mercuriel de l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse.

Dépôt : 10 µl de la solution chloroformique. La migration s'effectue à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

β. Révélateur

Après séchage de la plaque, on pulvérise une solution à 2 % de diphénylcarbazide se colorant en violet avec l'ion mercurique.

γ. Résultats

Le composé d'addition mercuriel sur le motif acrylique

de l'acide organique donne une tache de coloration violette, dont le Rf est respectivement de 0,20 dans le solvant spécifique I, alors qu'il est de 0,72 dans le solvant II.

3) Caractérisation et dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique par chromatographie en phase vapeur

a) Caractérisation

Les acides organiques dont la fonction acide est libre n'ont pas une tension de vapeur suffisante pour passer en phase gazeuse à température raisonnable, ce qui nécessite la préparation de dérivés plus volatils.

Les diverses méthodes proposées consistent à estérifier le groupe carboxylique pour obtenir, soit les esters triméthylsilylés, soit les esters méthylique ou éthylique des acides correspondants.

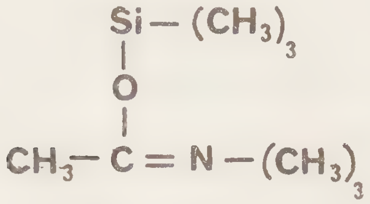
Il faut également signaler que certains acides-alcools peuvent être transformés en dérivés triméthylsilyl esters / triméthylsilyl ethers ou en dérivés méthyl esters / triméthylsilyl ethers (HORII, MAKITA, TAMURA, 1965) et (DALGLEISH, HORNING E.C., HORNING M.G., KNOX, YARGER, 1966).

Nous avons donc choisi de préparer le dérivé triméthylsilylé et l'ester méthylique de l'acide hydroxyméthylacrylique que nous avons ensuite soumis à l'analyse.

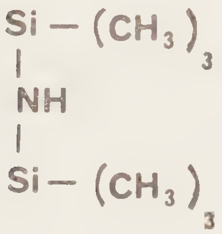
(1) Préparation des dérivés triméthylsilylés

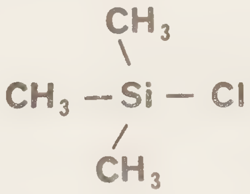
α. Réactifs utilisés

. N-O bis triméthylsilyl acétamide (B.S.A.)




. Hexaméthyldisilazane et triméthylchlorosilane




. Pyridine pure pour analyse exempte d'eau (réactif MERCK)

β. Mode opératoire

10 mg d'acide hydroxyméthylacrylique obtenu par synthèse sont dissous dans un $cm^3$ de pyridine anhydre ; 0,2 $cm^3$ de réactif silylant (B.S.A.) ou 0,1 cm3 de triméthylchlorosilane et 0,2 $cm^3$ d'hexaméthyl-disilazane sont alors ajoutés à la solution pyridinique d'acide organique. La silylation est théoriquement complète en quelques minutes. Cependant, comme le préconise DALGLEISH, HORNING E.C., HORNING M.G., KNOX et YARGER (1966), il est prudent d'abandonner le mélange réactionnel pendant 12 heures à la température du laboratoire. L'échantillon est alors prêt pour l'analyse.

γ. Chromatographie gazeuse du dérivé triméthylsilylé de l'acide hydroxyméthylacrylique

. Conditions opératoires

- Appareil : Girdel 75 - CS
- Four : Girdel 75 - FD - 1
- Colonnes : Inox ; 1,5 m ; diamètre intérieur 1/8ème de pouce ; 5 % SE - 30 sur chromosorb W. HMDS ; 100 - 120 mesh
- Gaz porteur : azote ; débit : 26 $cm^3$/minute
- Température de l'injecteur : 225°C
- Température de la colonne de 110°C à 170°C (programmation : 15°C/minute)
- Détecteur à ionisation de flamme ; débit d'hydrogène : 25 $cm^3$/minute ; débit d'air : 350 $cm^3$/minute
- Atténuation : 1/128
- Enregistreur : Techmation
- Vitesse de déroulement du papier : 12 mm/minute
- Volume injecté : 2 µl

☐ Résultats

Comme le montre la figure n° II le temps de rétention est de 3 minutes en prenant pour point de départ de l'injection le front du solvant.

### (2) Préparations des dérivés méthylés

Parmi les nombreux agents de méthylation tels que le diazométhane, le méthanol trifluorure de bore, le méthanol additionné d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique, le méthanol chlorhydrique en présence de chlorure de thionyle, nous en avons retenu deux : le méthanol trifluorure de bore et le diazométhane.

Figure n° II : Analyse par chromatographie en phase vapeur du dérivé triméthylsilylé de l'acide hydroxyméthylacrylique

α. Méthode d'estérification par le méthanol trifluorure de bore (KUKSIS, VISHWAKARMA, 1963) ; (LUKE, FREEMANN, KIER, 1963) ; (ALCOCK, 1965) .

❑ Réactif utilisé

• Méthanol renfermant 14 % de trifluorure de bore (commercialisé par les laboratoires Sigma).

❑ Mode opératoire

10 mg d'acide hydroxyméthylacrylique obtenu par synthèse sont dissous dans 1 $cm^3$ de solution méthanolique de trifluorure de bore. Le mélange réactionnel abandonné à la température ambiante pendant 12 h est alors soumis à l'analyse.

β. Méthode d'estérification par le diazométhane (CANVIN, 1965) ; (KEOWN, READ, 1965) ; (DALGLEISH, HORNING E.C., HORNING M.G., KNOX et YARGER, 1966) ; (ESTES, BACKMANN, 1966)

❑ Réactifs

• Solution éthérée de diazométhane

Dans un tube à dégagement sont introduits successivement 5 $cm^3$ de potasse aqueuse à 60 %, 0,7 $cm^3$ de 2(éthoxyethoxy) éthanol, puis 0,7 $cm^3$ d'ether éthylique. 250 à 300 mg de N méthyl N-nitroso-paratoluène sulfonamide dissous dans 10 $cm^3$ d'ether éthylique sont alors versés dans le tube à dégagement qui est aussitôt bouché. Le diazométhane qui se dégage lentement est entrainé par un courant d'azote dans un tube contenant de l'ether éthylique anhydre et refroidi par immersion dans un bain de glace. On obtient en fin d'opération une solution éthérée jaune.

• Méthanol redistillé juste avant l'emploi

❑ Mode opératoire

A une solution de 10 mg d'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse dans 1 $cm^3$ de méthanol, refroidie à - 20°C dans un bain de glace et d'acétone, on ajoute doucement le diazométhane refroidi à - 20°C jusqu'à ce qu'un léger excès de celui-ci colore le milieu en jaune. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec sous un courant d'azote et à basse température afin d'éviter toute perte en ester méthylique. Une fraction aliquote du résidu repris par 1 $cm^3$ de méthanol (5 µl) sera injectée directement dans l'appareil de chromatographie en phase vapeur.

γ. Chromatographie gazeuse des dérivés méthylés de l'acide hydroxyméthyacrylique

. Conditions opératoires

- Appareil : Girdel 75 - CS
- Four : Girdel 75 - FD - 1
- Colonnes : Inox : 2,5 m ; diamètre intérieur : 1/8ème de pouce ; 4 % Diéthylène glycolsuccinate sur chromosorb G, DMCS, 80/100 mesh
- Gaz porteur : azote ; débit : 20 $cm^3$/minute
- Température de l'injecteur : 200°C
- Température du détecteur : 190°C
- Température de la colonne de 80°C à 160°C (programmation de 1°C/minute, débutant 7 minutes après l'injection de l'échantillon)

- Détecteur à ionisation de flamme ; débit d'hydrogène : 25 $cm^3$/ minute ; débit d'air : 350 $cm^3$/minute
- Atténuation : 1/128
- Enregistreur : Techmation
- Vitesse de déroulement du papier : 10 cm/heure
- Volume injecté : 5 µl

δ. Résultats

Quelle que soit la méthode utilisée pour préparer les dérivés méthylés de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin, il n'apparaît sur les enregistrements chromatographiques (figure n° III) qu'un pic dont le temps de rétention est alors de 52 minutes. Ce long temps de rétention nous a été imposé, comme nous le verrons par la suite, lorsqu'il faut déterminer l'acide hydroxyméthylacrylique en présence d'autres acides organiques.

b) Dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique

Nous avons choisi d'utiliser la formation de dérivés méthylés à l'aide du diazométhane pour ses qualités de facilité d'emploi, de rapidité, de sensibilité et de reproductibilité satisfaisante.

En effet, une gamme réalisée en traitant par le diazométhane des quantités croissantes d'acide hydroxyméthylacrylique, nous a permis de vérifier la régularité de l'estérification et la linéarité de la réponse du détecteur pour la zone de concentrations étudiées allant de 5 à 40 µg (Figure n°IV).

Remarques : Pour des mêmes volumes d'injection, le méthylester de l'acide hydroxyméthylacrylique préparé par la méthode au diazométhane donne un

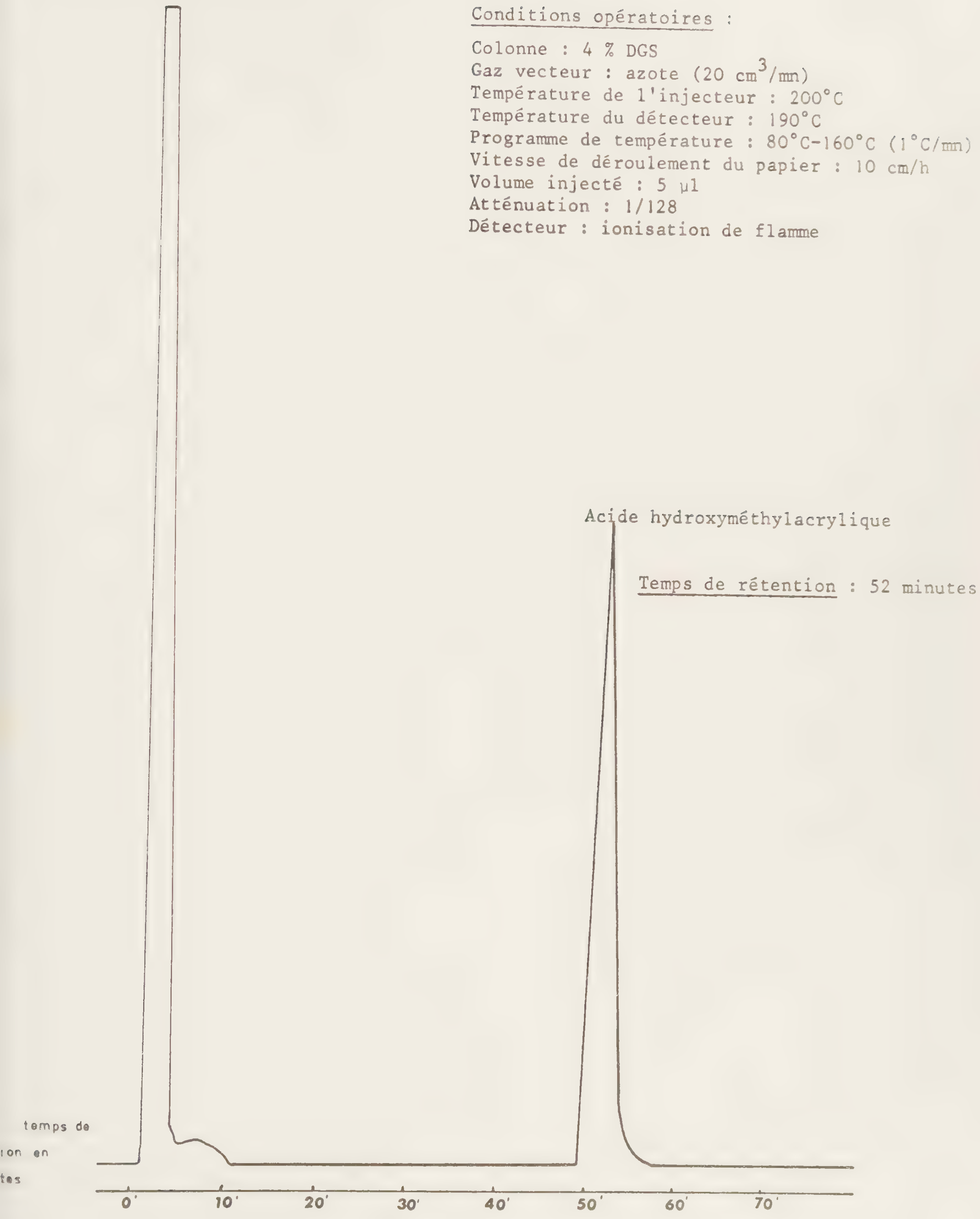
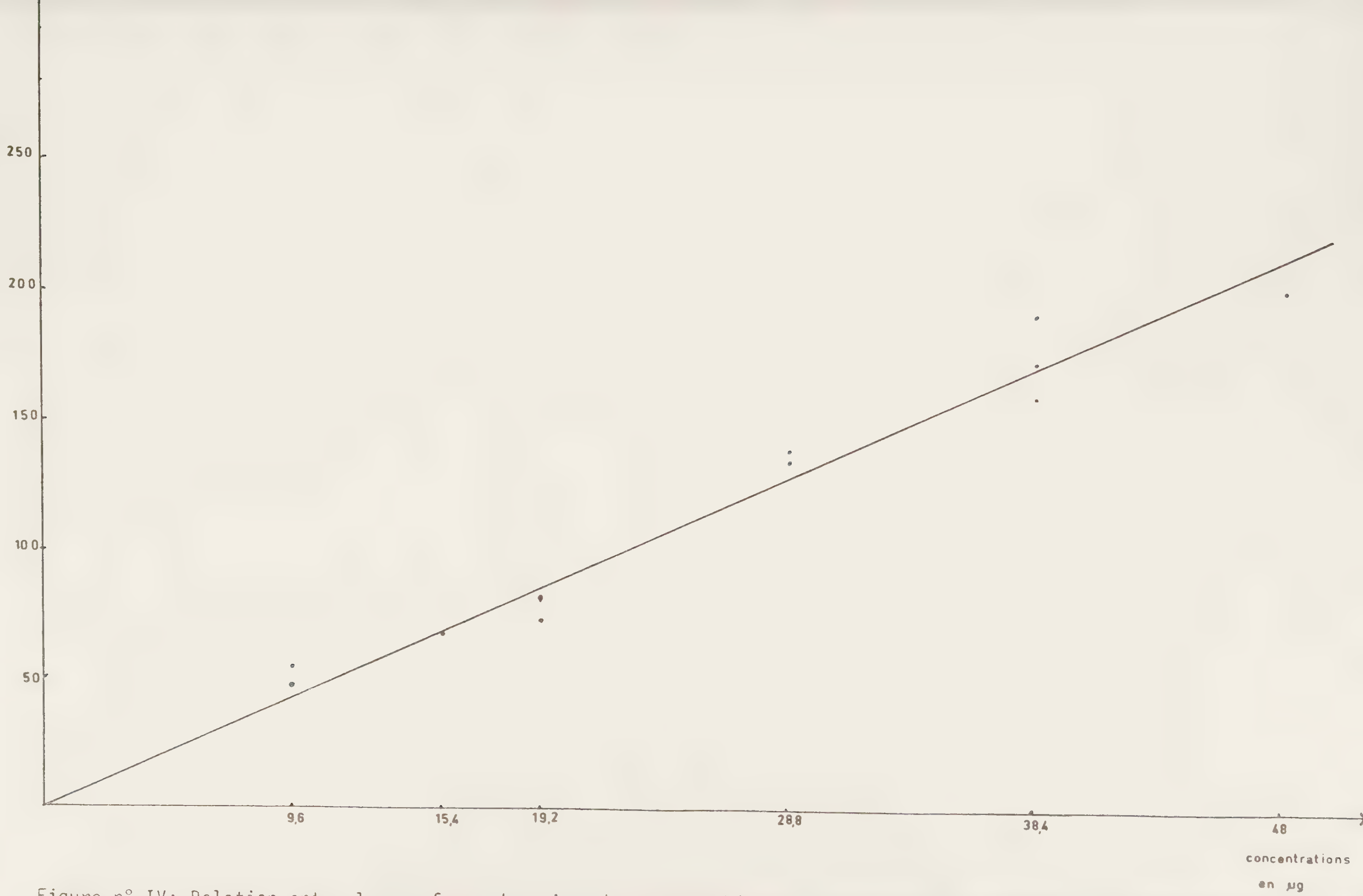



Figure n° III : Analyse par chromatographie en phase vapeur du dérivé méthylé de l'acide hydroxyméthylacrylique




<u>Figure n° IV</u>: Relation entre les surfaces des pics chromatographiques appréciés par un détecteur à ionisation de flamme et les quantités croissantes d'H.M.A.* soumises à la méthylation par le diazométhane

* hydroxyméthylacrylique

pic dont la surface est environ cinq fois supérieure à celle du pic correspondant au même dérivé préparé par le trifluorure de bore sur les mêmes quantités d'acide alcool libre. L'hypothèse d'une mauvaise estérification de l'acide organique par le méthanol trifluorure de bore vient donc immédiatement à l'esprit, bien que ce réactif, certainement plus violent que le diazométhane, soit quand même l'un des agents de méthylation les plus efficaces. Il faut cependant remarquer que l'acide est très rapidement méthylé en présence de diazométhane (la réaction demandant au maximum 3 minutes) tandis que la méthylation par le trifluorure de bore est menée pendant 12 heures. Il est bien évident que l'on peut alors penser que ce long laps de temps peut permettre un certain nombre de réactions parasites, comme par exemple une polymérisation éventuelle plus ou moins complète du dérivé acrylique, série chimique dont on sait qu'elle a une grande habilité à le faire.

On se doute bien que les produits polymérisés ne pourraient plus sortir dans les conditions de chromatographie choisies.

# CHAPITRE II : PREPARATION DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE A PARTIR DE LA CYNAROPICRINE ET IDENTIFICATION

## A - Mise au point d'une méthode d'hydrolyse

Théoriquement, l'hydrolyse de la cynaropicrine peut être effectuée soit par voie alcaline, soit par voie acide. Il est cependant nécessaire de préciser les conditions optimales permettant à la fois d'hydrolyser la totalité de la cynaropicrine, et de ne pas altérer l'acide hydroxyméthylacrylique libéré.

Pour vérifier la première exigence, nous nous sommes assurés de la disparition totale de la cynaropicrine dans les hydrolysats par un essai de chromatographie en couche mince dans les conditions décrites page17.

Pour vérifier la deuxième exigence, nous avons traité, dans des conditions rigoureusement comparables, l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse et la cynaropicrine par des solutions aqueuses de soude et d'acide sulfurique de titres différents et pendant des temps variables.

Les protocoles opératoires ont été les suivants :

### 1) Hydrolyses en milieu alcalin

2 g de cynaropicrine brute, extraite par la méthode décrite précédemment, ou 40 mg d'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse sont additionnés de 50 $cm^3$ d'eau distillée, puis soumis à des hydrolyses alcalines par 5 $cm^3$ d'hydroxyde de sodium en solution aqueuse de titre allant de 0,5 N à 2 N. Après un chauffage à reflux d'une heure, puis refroidissement, les hydrolysats sont agités pendant deux heures avec 20 g de charbon végétal (Noir Norit). Après filtration, les liquides

incolores obtenus, acidifiés à pH 1,5 par l'acide chlorhydrique concentré, sont épuisés à cinq reprises successives par chaque fois 50 $cm^3$ du mélange : n-butanol - acétate d'éthyle (1-1, V/V).

Les liqueurs extractives sont réunies et le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite à température inférieure à 50°C, les résidus desséchés sous vide phosphorique, puis repris par 1 $cm^3$ de méthanol, fournissent des liquides jaune clairs sur lesquels la caractérisation de l'acide hydroxyméthylacrylique pourra être tentée.

2) Hydrolyses en milieu acide

2 g de cynaropicrine brute ou 40 mg d'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse sont additionnés de 50 $cm^3$ d'eau distillée. Les milieux sont alors acidifiés par 3,5 $cm^3$ de solutions d'acide sulfurique de titre allant de 0,5 N à 36 N. Les liqueurs sont portées à l'ébullition pendant une heure sous réfrigérant à reflux, puis alcalinisées à pH 8 par addition d'hydroxyde de sodium, et enfin décolorées sur charbon. Les filtrats réacidifiés à pH 1,5 sont ensuite épuisés par le mélange n-butanol - acétate d'éthyle (1-1, V/V) dans les conditions décrites ci-dessus. Les résidus d'évaporation des liqueurs extractives, desséchés sous vide phosphorique sont comme précédemment repris par 1 $cm^3$ de méthanol.

3) Etude analytique des produits d'hydrolyse

a) Réactions colorées

Les réactions de BERG et d'UFFELMANN appliquées aux différentes

solutions méthanoliques ont toujours été fortement positives.

b) Chromatographie en couche mince

Nous avons systématiquement repris les conditions opératoires décrites lors de l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse.

40 µl des solutions méthanoliques ayant repris les résidus provenant des hydrolyses ont été comparés à 10 µl d'une solution méthanolique à 1 % d'acide hydroxyméthylacrylique témoin.

Nous analyserons tout d'abord les résultats concernant les hydrolyses alcalines conduites en présence de 5 $cm^3$ de soude N et les hydrolyses acides conduites avec 0,5 $cm^3$ d'acide sulfurique 0,5 N que nous appelerons "ménagées", car seules ces hydrolyses ont fourni des chromatogrammes sur lesquels n'apparaît, après pulvérisation par des différents réactifs, qu'une seule tache. Les autres conditions d'hydrolyse ont paru provoquer des transformations importantes que nous discuterons par la suite.

(1) Hydrolyses ménagées de la cynaropicrine et de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin (soude N ; acide sulfurique 0,5 N)

α. Chromatogrammes développés dans les solvants alcalins

Après révélation par le dichlorophénolindophénol, il apparait, pour la cynaropicrine comme pour l'acide hydroxyméthylacrylique témoin, une tache rose dont le Rf est respectivement de 0,48 (solvant A) et de 0,50 (solvant B).

β. Chromatogrammes développés dans le solvant C

Nous obtenons dans les deux cas, après révélation par les réactifs particuliers de l'acide hydroxyméthylacrylique les résultats suivants :

| | | |
|---|---|---|
| Réactif phosphomolybdique, | tache bleue, | Rf = 0,50 |
| Réactif de Schweppe, | tache brune, | Rf = 0,50 |
| Réactif à l'acide chromotropique, | tache brun orangé , | Rf = 0,50 |
| Réactif à la p-nitraniline diazotée, | tache rouge violacé , | Rf = 0,50 |

Dans tous les chromatogrammes, les réactions fournies sont celles de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin, les Rf et les colorations étant identiques.

γ. Chromatogrammes développés dans les solvants I et II

500 mg du résidu d'extraction provenant des hydrolyses ont été additionnés de 25 $cm^3$ de réactif à l'acétate mercurique selon la technique décrite page 36 pour le composé étalon. 10 µl de la solution chloroformique finale ont été déposés sur la plaque. La chromatographie révèle la présence d'une dérivé d'addition mercuriel possédant les mêmes caractéristiques que celui fourni par l'acide hydroxyméthylacrylique témoin (Rf ÷ 0,20 dans le solvant spécifique I et Rf = 0,72 dans le solvant II ; coloration violette fournie par le réactif à la diphénylcarbazide).

② Autres conditions d'hydrolyse

L'attaque de la cynaropicrine et de l'acide hydroxyméthylacry-

lique témoin par des solutions de soude de titre supérieur à N et pendant des temps variables se manifeste par l'apparition sur les chromatogrammes de nombreuses taches se révélant toutes à l'acide chromotropique alors que certaines se révèlent aussi par le réactif de SCHWEPPE. Le même phénomène se produit à la suite d'hydrolyses par des solutions acides de titre supérieur à 0,5 N. Il faut cependant signaler que les taches sont alors toujours beaucoup plus nombreuses que celles obtenues après hydrolyses alcalines (fig. n° V).

Si la structure des composés alors obtenus n'a pu être établie en raison de la complexité des transformations, il semble possible, tout au moins pour les taches de Rf inférieur à celui de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin, et surtout lors des hydrolyses acides, d'invoquer une polymérisation de la molécule, que l'on sait fréquente dans la série acrylique.

c) Chromatographie en phase vapeur

(1) Hydrolyses ménagées (soude N et acide sulfurique 0,5

α.Dérivés triméthylsilylés

☐ Technique

L'acide alcool, qu'il provienne des hydrolyses de la cynaropicrine ou des "hydrolyses" de l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse, a subi le même traitement. Les extraits butanoliques contenant l'acide alcool résultant des hydrolyses de 2 g de cynaropicrine ou de 40 mg d'acide hydroxyméthylacrylique témoin sont évaporés à sec. Les résidus desséchés sous vide phosphorique sont repris par 5 $cm^3$ de méthanol. 2 $cm^3$ de ces solutions méthanoliques sont alors traités par le réactif silylant.

Conditions opératoires

Solvant de migration :
Toluène - formiate d'éthyle - acide formique (5-4-1, V/V)
Révélateur : Acide chromotropique
Distance de migration : 15 cm

Acides organiques

1 - Hydroxyméthylacrylique hydrolys en milieu alcalin

2 - Hydroxyméthylacrylique hydrolys en milieu acide 2 N

3 - Hydroxyméthylacrylique témoin

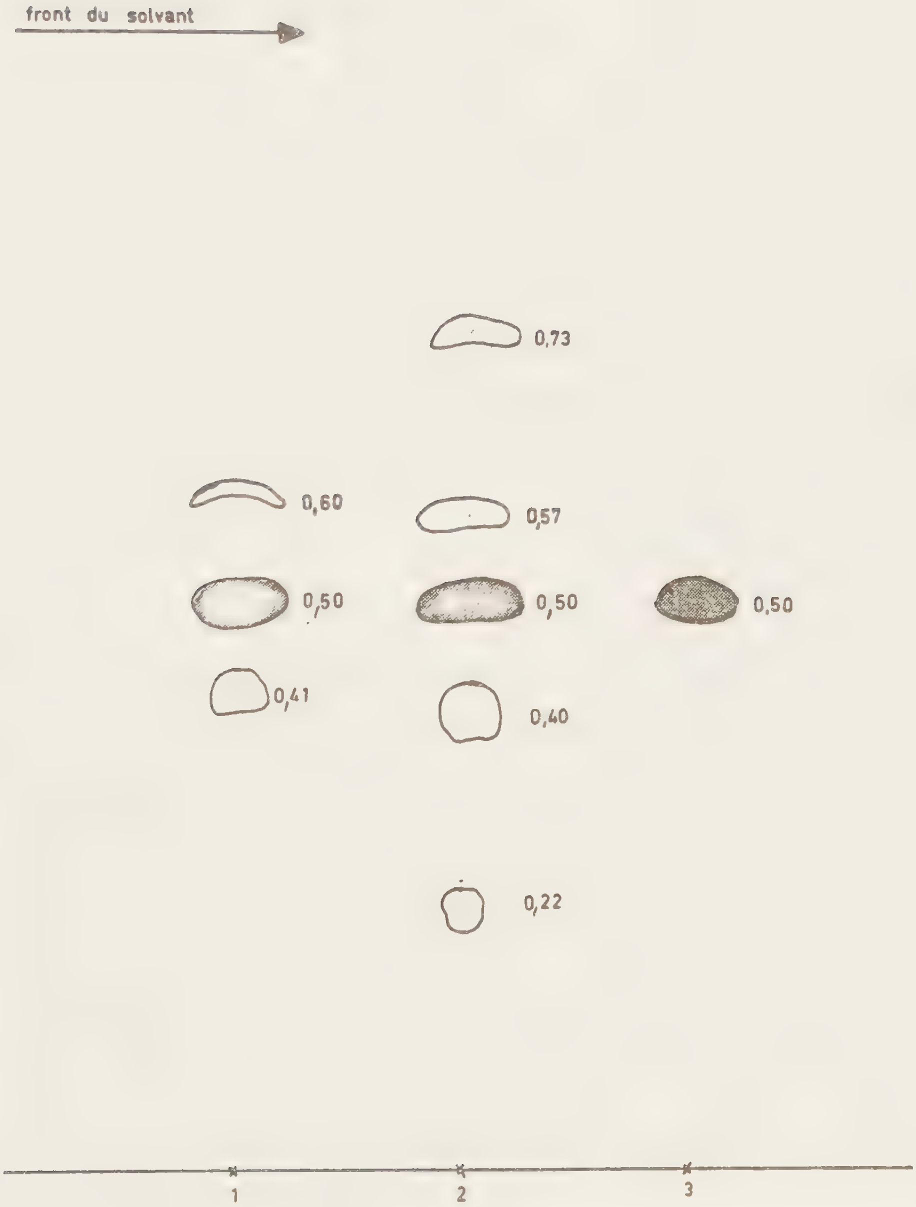



Figure n° V : Chromatographie sur couche mince des produits provenant de l'acide hydroxyméthylacrylique hydrolysé par des solutions de soude de titre supérieur à N ou d'acide sulfurique de titre supérieur à 0,5 N.

Dans ce but, après évaporation du méthanol, les résidus sont dissous dans 1 $cm^3$ de pyridine, puis 0,2 $cm^3$ de réactif bis-triméthylsilylacétamide ou 0,1 $cm^3$ de triméthylchlorosilane et 0,1 $cm^3$ d'hexaméthyldisilazane sont ajoutés à ces solutions pyridiniques.

2 µl de chaque mélange sera alors injecté dans l'appareil à chromatographie en phase vapeur.

☐ Résultats

Sous forme de dérivé triméthylsilylé l'acide alcool provenant aussi bien des hydrolyses de la cynaropicrine que des hydrolyses de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin ne donne naissance qu'à un seul pic par chromatographie en phase vapeur et dont le temps de rétention est analogue à celui du dérivé triméthylsilylé de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin ( tableau n° 7).

β. Dérivés méthylés

☐ Méthode au trifluorure de bore

Les résidus butanoliques obtenus après les hydrolyses de la cynaropicrine ou de l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse, privés de toute trace d'eau par séchage sous vide phosphorique, sont dissous dans 5 $cm^3$ de méthanol redistillé juste avant l'emploi. Les résidus d'évaporation de ces solutions sont alors repris par 1 $cm^3$ de méthanol trifluorure de bore. 5 µl des mélanges réactionnels laissés à la température du laboratoire pendant 12 heures seront ensuite soumis à l'analyse.

☐ Méthode au diazométhane

Les différents résidus butanoliques ont comme précédemment été

| DERIVES TRIMETHYLSILYLES | TEMPERATURE DE COLONNE | TEMPS DE RETENTION |
|---|---|---|
| Acide hydroxyméthylacrylique témoin | 155°C | 3 minutes |
| Acide alcool extrait après hydrolyse de la cynaropicrine par 5 $cm^3$ de soude N ou par 3,5 $cm^3$ d'acide sulfurique 0,5 N | 155°C | 3 minutes |
| Acide alcool extrait après hydrolyse de l'acide hydroxyméthylacrylique par 5 $cm^3$ de soude N ou par 3,5 $cm^3$ d'acide sulfurique 0,5 N | 155°C | 3 minutes |

Tableau n° 7 : Comparaison des températures de colonne et des temps de rétention du dérivé triméthylsilylé de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin et des dérivés triméthylsilylés de l'acide extrait après hydrolyse de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin ou de la cynaropicrine.

repris, après déshydratation totale sous vide phosphorique par 5 $cm^3$ de méthanol. 2 $cm^3$ de ces dernières solutions seront alors traités par le diazométhane dans des conditions analogues à celles décrites page 43. 5 µl des solutions méthanoliques finales seront soumis à l'analyse.

. Résultats

Dans ces conditions, quelle que soit la méthode d'estérification, il n'apparait sur les enregistrements chromatographiques qu'un seul pic dont le temps de rétention est analogue à celui de l'acide hydroxyméthylacrylique de référence (tableau n°8 ).

(2) Résultats fournis par d'autres conditions d'hydrolyse

Les résidus butanoliques provenant des hydrolyses de la cynaropicrine et de l'acide hydroxyméthylacrylique par des solutions de soude de titre supérieur à N, ou par des solutions d'acide sulfurique de titre supérieur à 0,5 N fournissent après traitement par le diazométhane des enregistrements où l'on trouve, outre le pic correspondant à l'acide hydroxyméthylacrylique témoin, de nombreux autres pics (fig. n°VI).

L'analyse des résultats obtenus en traitant les mêmes résidus par le bis-triméthylsilylacétamide conduisent à faire les mêmes constatations. Il faut cependant signaler que dans ce cas, les produits sont beaucoup moins bien séparés, certains d'entre eux sortant presque au même niveau que le dérivé triméthylsilylé de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin.

4) Conclusions

Si a priori, l'hydrolyse de la cynaropicrine peut être effectuée sans difficulté, nos différents essais nous ont montré qu'il était

| DERIVES METHYLES | TEMPERATURE DE COLONNE | TEMPS DE RETENTION |
|---|---|---|
| Acide hydroxyméthylacrylique témoin | 132°C | 52 minutes |
| Acide hydroxyméthylacrylique extrait après hydrolyse alcaline de la cynaropicrine | 132°C | 52 minutes |
| Acide hydroxyméthylacrylique extrait après hydrolyse acide de la cynaropicrine | 132°C | 52 minutes |

Tableau n° 8 : Comparaison des températures de colonne et des temps de rétention du dérivé méthylé de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin et des dérivés méthylés de l'acide hydroxyméthylacrylique extrait après hydrolyse alcaline et acide.

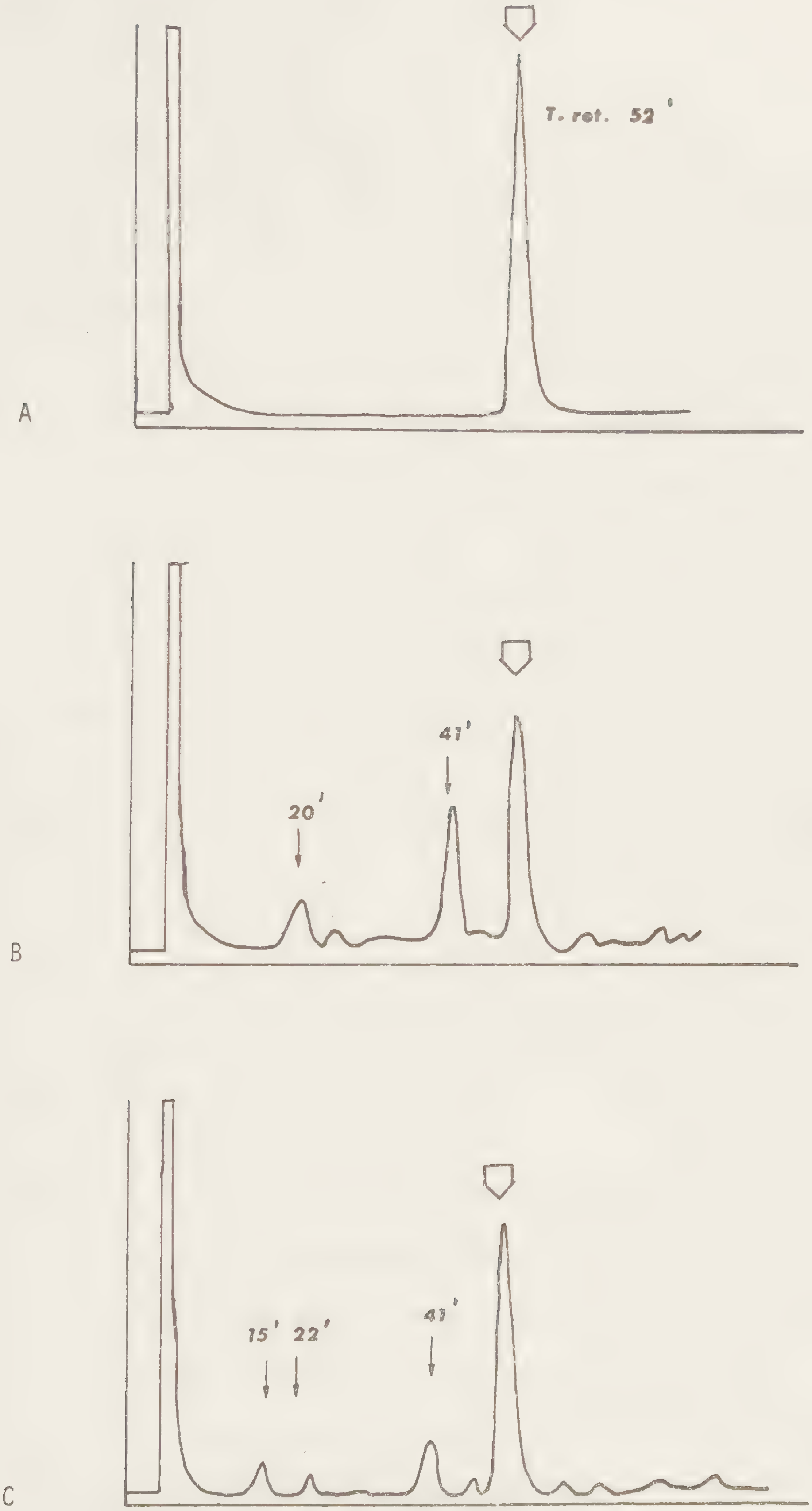



Figure n° VI : Aspect des enregistrements obtenus en chromatographie en phase vapeur de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin (A) ou "hydrolysé" en milieu alcalin N (B) et en milieu acide N (C).

nécessaire de l'effectuer dans des conditions strictes. En effet, comme nous venons de le constater, l'attaque du principe amer ou de l'acide hydroxyméthylacrylique de synthèse par des solutions trop acides ou trop alcalines provoque la transformation de la molécule acrylique, ce qui se manifeste par l'apparition de nombreux autres produits mis en évidence aussi bien par chromatographie en couche mince que par chromatographie en phase vapeur. Il est donc nécessaire d'opérer dans un milieu NaOH N ou $H_2SO_4$ 0,5 N.

Il nous a été ainsi possible de mettre au point deux méthodes d'hydrolyse, l'une en milieu alcalin, l'autre en milieu acide, permettant de libérer totalement et sans l'altérer l'acide hydroxyméthylacrylique du noyau guaianolide de la cynaropicrine. Par voie de conséquence le dosage du principe amer des feuilles d'Artichaut pouvait être envisagé.

B - Application du dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique au dosage indirect de la cynaropicrine

1) Mode opératoire

Puisqu'il est donc possible de quantifier l'acide hydroxyméthylacrylique primitivement combiné au reste guaianolide de la cynaropicrine et de l'en détacher par hydrolyse, la teneur en principe amer des feuilles d'Artichaut peut être évaluée indirectement.

Dans un premier temps, on extrait la cynaropicrine brute de 100 g de feuilles sèches d'Artichaut. La méthode d'extraction alcoolique décrite précédemment (page16) et qui semble d'un bon rendement a été adoptée en la complétant pour plus de sécurité par deux extractions

supplémentaires par l'alcool à 80° et en effectuant trois épuisements successifs au chloroforme dans un appareil à contre-courant. La réaction d'ASHINA ET YODA, caractéristique de la cynaropicrine a toujours été négative sur le résidu d'évaporation du dernier épuisement chloroformique, ce qui assure d'une bonne extraction du principe amer par les deux précédentes.

Dans un deuxième temps, après évaporation des solutions chloroformiques, le résidu de cynaropicrine brute a subi une hydrolyse alcaline ou acide dans les conditions optimales précédemment fixées. L'acide hydroxyméthylacrylique ainsi libéré dans l'hydrolysat, décoloré sur charbon, a été extrait par le mélange n-butanol - acétate d'éthyle (1-1, V/V). Après évaporation des solutions butanoliques, le nouveau résidu obtenu est totalement déshydraté sous vide phosphorique : l'acide hydroxyméthylacrylique en est repris à chaud par du méthanol que l'on réduit ensuite au volume de 5 $cm^3$. Une fraction aliquote (2 $cm^3$) de cette solution finale peut être alors traitée par le diazométhane, puis analysée par chromatographie en phase vapeur.

2) Résultats

Chaque fois qu'un dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique provenant de la cynaropicrine a été tenté, nous avons systématiquement comparé les surfaces des pics obtenus à celles fournies par une gamme étalon fraîchement préparée et traitée dans les mêmes conditions. Les quantités d'acide hydroxyméthylacrylique retrouvées sur six échantillons de 100 g de feuilles sèches d'Artichaut, sont reportées sur le tableau n°9 . Les moyennes sont de 31,50 mg $\pm$ 1,9 d'acide hydroxyméthylacrylique

| ECHANTILLONS | EXTRACTION APRES HYDROLYSES ACIDE | ALCALINE |
|---|---|---|
| n° 1 | 33,38 | 27,16 |
| n° 2 | 29,59 | 29,18 |
| n° 3 | 29,47 | 43,24 |
| n° 4 | 33,23 | 28,83 |
| n° 5 | 31,50 | 31,93 |
| n° 6 | 31,91 | 29,93 |

Tableau n° 9 : Quantités d'acide hydroxyméthylacrylique trouvées sur six échantillons de 100 g de feuilles sèches d'Artichaut provenant d'un même lot.

libéré après hydrolyse acide et de 30,22 mg $\pm$ 2,7 lorsque l'hydrolyse a été alcaline.

En considérant que le poids moléculaire de la cynaropicrine est de 346 et celui de l'acide hydroxyméthylacrylique est de 102, les quantités d'acide que nous avons retrouvé correspondent théoriquement à des concentrations de cynaropicrine de 1,02 ‰ dans les feuilles sèches d'Artichaut si l'on considère l'hydrolyse alcaline et de I,08 ‰ si l'on considère l'hydrolyse acide. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont donc comparables.

3) Discussion

Il n'a malheureusement pas été possible de trouver dans la littérature, des teneurs en cynaropicrine fournies par les différents auteurs ayant travaillé le sujet et qui nous auraient permis d'avoir une référence.

Le résidu obtenu après les extractions et purifications successives peut être soit très pur, mais au prix de pertes importantes rendant le dosage quantitatif aléatoire, soit impur à dessein pour ne rien perdre mais la pesée est alors sans signification. C'est pourquoi le dosage indirect que nous proposons, nous a paru une approche plus rigoureuse. Une extraction grossière du principe amer ne nous apparait pas comme un inconvénient, car la chromatographie en phase vapeur qui sert pour le dosage apporte de bonnes garanties de spécificité, l'acide hydroxyméthylacrylique étant alors caractérisable sans discussion

Il faut pourtant bien souligner que la cynaropicrine n'est pas toujours le seul principe amer capable de fournir de l'acide hydroxyméthylacrylique. En effet, les plants polonais d'Artichaut renferment également de la déshydrocynaropicrine, à chaîne latérale hydroxyméthyla-

crylique. Nous doserons donc dans ce cas le bloc de ces principes amers. Par contre, dans l'Artichaut italien, qui renferme un autre principe amer ne possédant pas une telle chaine latérale, notre méthode exprime la cynaropicrine seule. Il semblerait en être de même pour les plants français, dans lesquels seule la cynaropicrine a jusqu'à présent été décrite.

# CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE L'ACIDE HYDROXYMETHYL-ACRYLIQUE SOUS SES DIVERSES FORMES DANS L'ARTICHAUT

## A - Recherche d'une méthode d'extraction directe

La présence d'acide hydroxyméthylacrylique libre dans la feuille d'Artichaut n'a jamais été signalée à notre connaissance. On peut toutefois se demander, si cette molécule présente sous forme combinée dans la cynaropicrine n'existe pas également à l'état libre ou sous d'autres formes.

### 1) Historique

Pour tenter d'isoler l'acide hydroxymethylacrylique éventuellement libre ou engagé dans d'autres combinaisons que la cynaropicrine dans la plante, milieu beaucoup plus complexe que celui que nous avons rencontré en isolant préalablement le principe amer, nous avons recherché parmi les méthodes générales d'extraction applicables aux acides alcools, celle qui s'adapterait le mieux à notre cas particulier.

Il fallait que cette méthode reste en outre aussi simple que possible et d'un rendement suffisant pour permettre un dosage correct du dérivé acrylique.

Dans ce but, la méthode de ROSENTHALER (in BRUNEL, 1952) nécessitant une prise d'essai de 100 g de substance sèche et une série d'extractions successives par l'ether de pétrole, l'ether éthylique, le chloroforme, l'alcool, l'eau distillée froide et bouillante et enfin l'eau fortement alcalinisée par la soude, ne pouvait être retenue en

raison de sa complexité et de l'évidente impossibilité de l'appliquer à un dosage.

Il en est de même de la méthode de PEPKOWITZ (1944) qui, bien que plus commode que la précédente, nécessite cependant un épuisement par l'ether éthylique du matériel végétal préalablement acidifié à pH 1 par l'acide nitrique pendant 17 à 20 heures pour être complète.

Il faut d'autre part signaler qu'une méthode d'extraction telle que celles que nous venons de décrire, présente a priori un inconvénient. En effet, l'acidification du matériel végétal indispensable pour obtenir une bonne extraction par un solvant peu polaire risque de libérer l'acide hydroxyméthylacrylique du noyau guaianolide de la cynaropicrine. Pour éviter un tel phénomène, nous avons d'abord choisi comme solvant d'extraction l'eau qui permet théoriquement d'extraire les acides organiques qu'ils soient sous forme acide libre ou sous forme de combinaison saline, et que plusieurs auteurs ont employé avec un certain succès (BALANSARD, 1952 ; MELQUIOND - FOURNIER, 1971).

2) Méthode d'extraction par l'eau en milieu neutre

a) Technique

20 g de plante sèche finement broyée sont additionnés de 250 cm$^3$ d'eau distillée. Après ébullition sous réfrigérant à reflux pendant une heure, le décocté refroidi est filtré, puis alcalinisé à pH 8 par une solution de carbonate de sodium à 10 % et enfin décoloré sur charbon végétal (noir Norit) jusqu'à obtention d'un filtrat incolore. Ce dernier acidifié à pH 1,5 par de l'acide chlorhydrique concentré est alors épuisé à 3 reprises successives par 50 cm$^3$ du mélange (n-)butanol-

acétate d'éthyle qui nousavait précédemment donné de bons résultats pour l'isolement de l'acide hydroxyméthylacrylique.

Si au cours de l'extraction, le solvant entraine environ 7 % d'eau, ce qui provoque le passage d'ions minéraux en phase organique, l'eau et le butanol forment un azéotrope qui distille sous pression réduite à température de 40°C. L'eau est donc éliminée dès le début de la concentration et lorsque le milieu est anhydre, il apparait un précipité constitué par des sels minéraux, de sodium et de potassium principalement, que l'on peut séparer facilement par filtration. Ce filtrat doit être à nouveau concentré sous pression réduite jusqu'à élimination totale du butanol. En fin d'opération le résidu repris par 1 $cm^3$ de méthanol conduit à un liquide de couleur cognac qui constituera notre matériel d'étude.

b) Caractères analytiques de l'extrait obtenu

(1) Vérifications préliminaires

Avant la recherche de l'acide hydroxyméthylacrylique libre, nous avons vérifié dans cet extrait l'absence de sucres réducteurs par la liqueur de Fehling et le réactif à la glucose-oxydase, et l'absence de tanins par le perchlorure de fer.

D'autre part, sur le résidu d'évaporation de deux gouttes de solution méthanolique, les réactions de BERG et d'UFFELMANN, prouvant la présence d'acides alcools sont ici faiblement positives.

Nous avons alors essayé de caractériser l'acide hydroxyméthylacrylique dans cet extrait méthanolique par chromatographie en couche mince, puis d'apprécier le rendement par chromatographie en phase vapeur.

(2) Chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique et mise en évidence de l'acide hydroxyméthylacrylique

Les conditions opératoires sont identiques à celles utilisées lors de l'étude analytique des produits d'hydrolyse de la cynaropicrine.

Après migration dans le solvant C (acide) et révélation des chromatogrammes par les réactifs généraux tels que le réactif de SCHWEPPE et le réactif phosphomolybdique, il apparaît bien une tache faible de Rf = 0,50 semblant correspondre à l'acide hydroxyméthylacrylique, mais on révèle également d'autres taches, dont les Rf sont compris entre 0,11 et 0,68.

La méthode d'extraction choisie, nous a donc permis d'extraire à partir de la plante un "bloc acide" qui semble composé de plusieurs acides organiques, en particulier d'acides alcools, dont nous reprendrons l'analyse et l'identification dans un chapitre ultérieur.

Après pulvérisation des plaques par le réactif chromotropique, on obtient une tache de même Rf et de même coloration que celle fournie par l'acide hydroxyméthylacrylique. Pour confirmer ce résultat nous avons effectué la chromatographie de l'extrait dans les solvants A et B, où nous retrouvons une tache de Rf = 0,48 dans le solvant A et de 0,50 dans le solvant B. Ces taches correspondent à nouveau à notre acide.

En conclusion, la méthode d'extraction choisie nous a donc permis d'isoler un bloc acide dans lequel figure bien un composé correspondant à l'acide hydroxyméthylacrylique.

(3) Chromatographie en phase vapeur

Nous avons systématiquement repris les conditions opératoires

décrites lors de l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin. Le résidu butanolique résultant de l'extraction de 20 g de plante, totalement desséché sous vide phosphorique, est traité par le diazométhane après avoir été préalablement repris par 1 $cm^3$ de méthanol. La solution méthanolique finale est alors soumise à l'analyse.

α. Résultats

Outre la présence d'autres pics que nous étudierons par la suite, on retrouve sur les enregistrements un petit pic correspondant à l'acide hydroxyméthylacrylique mais qui en représente une quantité étonnament faible (quelques µg).

c) Conclusions

L'extraction de la plante par l'eau permet bien la mise en évidence de l'acide hydroxyméthylacrylique, mais en quantité faible. Nous avons été également frappés par la faible quantité des autres acides retrouvés par ce procédé d'extraction et mis en évidence par les critères analytiques choisis. C'est pourquoi, craignant un mauvais rendement d'extraction par cette méthode, nous avons recherché un autre procédé, utilisant comme solvant un alcool, le méthanol, en milieu légèrement acide pour détacher les acides organiques libres de leurs combinaisons salines et permettre ainsi leur passage dans le solvant d'extraction.

### 3) Extraction par le méthanol légèrement acide

#### a) Technique

20 g de plante sèche finement broyée, sont additionnés de 250 $cm^3$ de méthanol acidifié à pH 6 par 2 $cm^3$ d'acide chlorhydrique concentré.

Après 15 minutes de contact avec le solvant, le mélange est agité pendant 15 minutes dans un broyeur-extracteur tournant à une vitesse de 5 000 tours minute. La solution méthanolique est alors séparée par filtration et le résidu de filtration est rincé 2 fois par 100 $cm^3$ de méthanol. Les liqueurs méthanoliques réunies, sont évaporées sous pression réduite à 30°C, et le résidu d'évaporation est repris par 100 $cm^3$ d'eau distillée. La solution aqueuse, est alors alcalinisée à pH 8 par une solution de carbonate de sodium à 10 %, puis décolorée par passage sur charbon.

La liqueur aqueuse ainsi clarifiée , acidifiée à pH 1,5 par de l'acide chlorhydrique concentré, est alors épuisée à 3 reprises successives par 50 $cm^3$ du mélange : (n-)butanol - acétate d'éthyle (1-1, V/V). Les solutions butanoliques réunies sont comme précédemment évaporées et le résidu, repris par 1 $cm^3$ de méthanol, est analysé d'abord par chromatographie en couche mince puis par chromatographie en phase vapeur.

#### b) Résultats

Reprenant les protocoles opératoires utilisés précédemment, nous retrouvons par chromatographie en couche mince une tache ayant le

même Rf et donnant avec les différents réactifs les mêmes colorations que l'acide hydroxyméthylacrylique témoin.

La chromatographie en phase vapeur permet également de retrouver à côté des autres petits pics déjà signalés, un petit pic ayant le même temps de rétention (52 minutes) que l'ester méthylique de l'acide hydroxyméthylacrylique témoin.

Malgré un rendement d'extraction qui certes n'est pas supérieur à celui obtenu par la technique précédente, l'emploi du méthanol nous permet de confirmer la présence dans les feuilles d'Artichaut d'un bloc acide dans lequel figure l'acide hydroxyméthylacrylique.

Nous ne pourrons cependant dans les conditions d'extraction que nous venons de décrire, tenir pour certaine la présence de cet acide à l'état libre que lorsque nous aurons fait subir à la cynaropicrine le même traitement ; l'extraction par le méthanol légèrement acide, aussi bien que les alcalinisations par des solutions de carbonate de sodium à 10 % ayant pu hydrolyser partiellement le principe amer.

c) Vérification de la valeur des méthodes utilisées par application à la cynaropicrine

(1) Technique

500 mg de cynaropicrine sont dissous dans 50 $cm^3$ de méthanol acidifié par 2 $cm^3$ d'acide chlorhydrique concentré, La solution ainsi obtenue, abandonnée pendant 15 minutes est ensuite évaporée et le résidu d'évaporation est repris par 50 $cm^3$ d'eau distillée. Après alcalinisation à pH 8 par une solution de carbonate de sodium à 10 %, la solution

décolorée sur charbon végétal (noir Norit) ; ce qui sera également fait sur une solution aqueuse de cynaropicrine alcalinisée à pH 8 par la solution de carbonate de sodium précédente. Les filtrats renfermant éventuellement l'acide hydroxyméthylacrylique libéré du noyau guaianolide de la cynaropicrine à la suite de ces traitements, sont épuisés à plusieurs reprises par le mélange (n-)butanol - acétate d'éthyle. Les solutions butanoliques finales concentrées sont alors analysées par chromatographie sur couche mince.

(2) Résultats

Après migration dans le solvant C (toluène - formiate d'éthyle - acide formique) les chromatogrammes pulvérisés tout d'abord par les réactifs généraux (SCHWEPPE et phosphomolybdique) puis par les réactifs particuliers (acide chromotropique et (p)-nitraniline diazotée) ne laissent apparaître aucune tache.

d) Conclusion

Puisque le méthanol légèrement acidifié ainsi que l'alcalinisation par une solution de carbonate de sodium ne dénaturent pas la combinaison entre le noyau guaianolide de la cynaropicrine et sa chaine latérale acrylique, on peut affirmer que le dérivé acrylique extrait par les deux méthodes précèdemment étudiées (eau et méthanol acide), ne provient pas de la dégradation de la cynaropicrine et peut donc se trouver à l'état libre dans les feuilles d'Artichaut.

Une question reste cependant posée : les teneurs très faibles

trouvées pour l'acide hydroxyméthylacrylique ainsi que pour les autres acides organiques provenant des extractions par l'eau ou par le méthanol légèrement acide sont-elles vraiment proches des teneurs totales existant dans la plante ? Nous pourrons peut-être en avoir une meilleure idée en tentant d'extraire les acides concernés non plus en milieu neutre ou légèrement acide, mais après un traitement acide ou même alcalin nettement plus fort.

B - Isolement des acides organiques après hydrolyse acide ou alcaline

1) Techniques

a) Hydrolyse acide

20 g de feuilles sèches d'Artichaut, réduites en poudre grossière, sont mis en contact avec 150 $cm^3$ d'eau distillée additionnée de 3,5 $cm^3$ d'une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,5 N. Après ébullition sous réfrigérant à reflux pendant une heure, la liqueur est filtrée, puis alcalinisée à pH 8 au moyen d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium. Cette solution est alors décolorée sur charbon jusqu'à obtention d'un filtrat clair.

b) Hydrolyse alcaline

20 g de feuilles sèches de *Cynara scolymus* réduites en poudre grossière, sont additionnées de 150 $cm^3$ d'eau distillée. Le milieu est alors alcalinisé à pH 9 au moyen de 5 $cm^3$ d'une solution normale d'hydroxyde de sodium.

Après ébullition sous réfrigérant à reflux pendant une heure, le décocté refroidi est filtré, puis décoloré sur charbon végétal (noir Norit) jusqu'à obtention d'une liqueur incolore.

Les filtrats, qu'ils proviennent de l'hydrolyse acide ou alcaline sont alors, après acidification à pH 1,5 par de l'acide chlorhydrique concentré, épuisés à plusieurs reprises par 150 $cm^3$ du mélange (n-)butanol - acétate d'éthyle (1-1, V/V). Les résidus d'évaporation des solutions butanoliques repris par 1 $cm^3$ seront analysés, après quelques vérifications préliminaires, par chromatographie en couche mince puis par chromatographie en phase vapeur.

## 2) Caractères analytiques des extraits obtenus

### a) Vérifications préliminaires

Outre l'absence de sucres et de tanins, nous avons pu dans ces solutions vérifier l'absence de composés phénoliques et en particulier de cynarine par la réaction d'ARNOW (1937). En effet, lors des traitements en milieu acide ou alcalin, puis décoloration sur charbon végétal, l'ester dicaféyl - 1,3 quinique disparait ainsi que les acides caféique et quinique qui auraient pu provenir de son hydrolyse, car la réaction de HOFNER (1932) se manifestant par la coloration vermillon intense donnée par l'acide caféique avec le nitrite de sodium, ainsi que la coloration rouge obtenue par condensation du produit d'oxydation périodique de l'acide quinique (dialdéhyde citrique) avec l'acide thio - 2 barbiturique sont négatives (MESNARD et DEVAUX, 1963). Les réactions de BERG et d'UFELLMANN sont, par contre, fortement positives.

b) Chromatographie en couche mince

Les conditions opératoires étant identiques à celles utilisées précédemment, nous retrouvons outre les taches correspondant aux autres acides, une tache identifiable à l'acide hydroxyméthylacrylique ; ce qui d'ailleurs n'est pas étonnant puisque les traitements acides ou alcalins choisis hydrolysent le principe amer. Cependant, toutes les taches sont ici beaucoup plus importantes que celles qui étaient mises en évidence sur les résidus obtenus après extraction par l'eau ou le méthanol acide, pour des dépôts identiques (10 $\mu$l).

c) Chromatographie en phase vapeur

Si l'analyse qualitative des extraits méthylés au diazométhane nous donne des résultats voisins de ceux obtenus après injection des extraits provenant de l'extraction par l'eau ou par le méthanol légèrement acide, il n'en n'est pas de même sur le plan quantatif.

Ainsi, pour des quantités identiques de résidu d'extraction et des mêmes volumes d'injection, tous les pics ont ici des surfaces nettement supérieures à celles obtenues dans les cas précédents. Les autres acides organiques contenus dans les extraits faisant l'objet d'un chapitre ultérieur, nous ne donnerons ici que les résultats concernant l'acide hydroxyméthylacrylique.

Ainsi la quantité moyenne du dérivé acrylique total retrouvée sur 5 échantillons de 20 g de feuilles sèches d'Artichaut sont de 77,5 mg $\pm$ 2,1 après hydrolyse acide et de 71,2 mg $\pm$ 2,3 après hydrolyse alcaline. La méthode d'extraction après hydrolyse acide semble donc plus favorable que celle après hydrolyse alcaline. Ces résultats expriment la teneur totale de la plante en acide hydroxyméthylacrylique que celui-ci soit à l'état libre ou combiné au noyau guaianolide de la cynaropicrine.

En effet, par ces méthodes acide ou alcaline, la cynaropicrine s'hydrolyse totalement , libérant une quantité d'acide hydroxyméthylacrylique de 31,50 mg ± 1,9.

Il est donc possible d'évaluer la teneur en acide hydroxyméthylacrylique libre ou combiné sous une autre forme que la cynaropicrine par simple différence entre les deux valeurs.

3 ) Conclusions

Bien que les extractions par l'eau et le méthanol chlorhydrique nous aient permis d'identifier l'acide hydroxyméthylacrylique à l'état libre dans la plante, elles ne pouvaient être retenues en vue d'un dosage de ce dérivé acrylique. En effet, il est frappant de constater que les méthodes d'hydrolyses acide et alcaline inhabituelles en phytochimie permettent d'extraire les autres acides organiques qui vraisemblablement se trouvent à l'état libre dans la plante avec un rendement bien supérieur à celui obtenu par les méthodes précédentes. Il doit donc en être de même pour l'acide hydroxyméthylacrylique libre.

Malheureusement, ces méthodes hydrolysant totalement la cynaropicrine, qui libère ainsi sa fraction hydroxyméthylacrylique, ne permettent plus d'envisager le dosage direct de l'acide hydroxyméthylacrylique libre contenu dans la plante. C'est pour ces raisons, que les teneurs en acide hydroxyméthylacrylique libre n'ont pu être établies qu'en effectuant la différence entre la teneur en acide hydroxyméthylacrylique extrait par les méthodes agressives précédentes et qui correspond au dérivé acrylique total contenu dans la plante et la teneur en acide hydroxyméthylacrylique venant du principe amer que nous avons pu doser après extraction de la cynaropicrine. On peut ainsi dresser le tableau général suivant , correspondant aux résultats obtenus pour un même échantillon de feuilles sèches.

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Teneur en acide hydroxyméthylacrylique total | 77,5 mg |
| 2. | Teneur en acide hydroxyméthylacrylique provenant de l'hydrolyse de la cynaropicrine | 31,5 mg |
| 3. | Teneur en acide hydroxyméthylacrylique libre direct (eau ou méthanol acide) | 6,2 mg |
| 4. | Teneur en acide hydroxyméthylacrylique libre (ou engagée dans des combinaisons mal définies comme les autres acides organiques) | 46 mg |

Par ailleurs, l'acide hydroxyméthylacrylique a été accompagné dans ces extractions par un certain nombre d'acides organiques que nous allons maintenant étudier.

# CHAPITRE IV : LES AUTRES ACIDES ORGANIQUES DE L'ARTICHAUT

Lors de l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique, les résidus obtenus après les diverses extractions précitées de la plante sont, comme nous l'avons vu, riches en acides alcools. C'est sur ce matériel que nous avons entrepris leur caractérisation et leur dosage.

## A - Caractères analytiques des extraits

Afin d'identifier les autres acides qui constituent avec l'acide hydroxyméthylacrylique le "bloc acide" des feuilles sèches d'Artichaut, nous avons isolé et étudié des résidus résultant des extractions par l'eau neutre, acide ou alcaline (hydrolyses) ainsi que par le méthanol légèrement acide.

### 1) Réactions colorées

#### a) Réaction de DENIGES

(1) DENIGES I (DENIGES, CHELLE et LABAT, 1930) : Réaction au résorcinol sulfurique

A 0,5 $cm^3$ de solution butanolique, quelques cristaux de résorcine sont dissous. En ajoutant doucement 0,5 $cm^3$ d'acide sulfurique, une coloration rouge sang se développe rapidement.

La réaction se produit en général lorsque la structure des composés les rendent facilement destructibles par l'acide sulfurique à chaud, en fournissant des fonctions aldéhydiques. L'acide tartrique est le type même de corps donnant cette réaction. Les acides glycérique, érythrique, trioxyglutarique et plus généralement, un certain nombre

de composés possédant un groupe acide et la séquence $-\underset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}-\underset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}-$ réagissent en fournissant des colorations variées.

Bien que non spécifique, cette réaction est intensément positive sur les solutions butanoliques résultant de l'extraction par l'eau neutre et par le méthanol légèrement acide. Après hydrolyse acide ou alcaline de la plante, elle n'est que faiblement positive.

(2) DENIGES II (DENIGES, CHELLE et LABAT, 1930) :

Réaction au sulfate mercurique

0,5 $cm^3$ des différentes solutions butanoliques sont additionnés à 0,5 $cm^3$ de réactif au sulfate mercurique de DENIGES. Après ébullition, on ajoute deux gouttes de solution de permanganate de potassium à 2 %. La coloration dûe au permanganate disparaît aussitôt. Cette réaction qui passe pour spécifique de l'acide citrique, est dans tous les cas légèrement positive.

(3) DENIGES III (DENIGES, CHELLE et LABAT, 1930) :

Réaction à l'acétate mercurique

On mélange 0,5 $cm^3$ de solution d'acétate mercurique de DENIGES et 0,5 $cm^3$ de solution butanolique. Après ébullition du mélange, et addition de deux gouttes de solution aqueuse de permanganate de potassium à 2 %, on obtient une réaction franche sous forme de précipité blanc abondant. Cette réaction donnée comme spécifique de l'acide malique est positive dans tous les extraits.

b) Réaction au gaïacol sulfurique (BALANSARD et BERNARD, 1950)

En ajoutant 0,5 $cm^3$ d'acide sulfurique à 1 $cm^3$ de solution

alcoolique de gaïacol à 2 % et 0,5 $cm^3$ d'acide acétique, il apparaît une coloration bleue. La réaction non spécifique utilisée pour caractériser l'acide glycolique est positive dans tous les cas.

Ces réactions très générales que nous venons de décrire permettent d'établir le canevas suivant qui donne une indication quant à la nature des acides organiques présents dans les résidus.

| REACTION | ACIDE | SPECIFICITE | ACIDES INTERFERANT |
|---|---|---|---|
| Résorcinol sulfurique | tartrique | 0 | glycolique, glycérique, érythrique, trioxyglutarique |
| Sulfate mercurique | citrique | + | 0 |
| Acétate mercurique | malique | + | 0 |
| Gaïacol sulfurique | glycolique | ± | glycérique |

En conclusion, les feuilles d'Artichaut semblent riches en acides organiques, en particulier en acides alcools. Vu la complexité des milieux, nous avons tenté de fractionner ces extraits en utilisant la précipitation plombique.

2) Fractionnement des extraits par les sels de plomb

Les extraits butanoliques résultant de l'extraction de 2oo g de feuilles sèches d'Artichaut par les techniques précédemment décrites sont évaporés à sec. Chaque résidu solubilisé dans 100 $cm^3$ d'eau distillée est alors additionné d'une solution aqueuse à 10 % d'acétate neutre de plomb en quantité juste suffisante pour assurer la précipitation totale de certains acides organiques. Tout excès de réactif précipitant doit

être évité, car il peut entraîner une resolubilisation partielle du précipité. Après centrifugation, on ajoute au surnageant une solution d'acétate basique de plomb, ainsi qu'un large excès d'alcool à 96°. Un volumineux précipité apparaît, qui est également recueilli par centrifugation.

Les deux précipités ainsi obtenus, lavés à l'eau distillée, puis remis en suspension dans 50 $cm^3$ d'eau distillée, sont décomposés par l'hydrogène sulfuré. Après élimination du sulfure de plomb par filtration, les solutions aqueuses sont concentrées jusqu'au volume de 2 $cm^3$ à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Quant au surnageant final, pouvant contenir outre l'acide hydroxyméthylacrylique dont les sels de plomb sont à la fois solubles dans l'eau et dans l'alcool, d'autres acides organiques ayant les mêmes caractéristiques, il est décomposé par un courant d'hydrogène sulfuré. Après élimination du sulfure de plomb, la solution est concentrée comme précédemment, par distillation sous pression réduite. Le tableau n°10 résume les étapes successives du fractionnement plombique.

Nous avons alors pratiqué sur chacune de ces trois solutions aqueuses, les réactions colorées décrites précédemment, en tenant compte de leur spécificité relative. Elles nous ont montré que cette technique de précipitation dont le caractère dichotomique simple n'est pas à négliger, ne permet pas un fractionnement rigoureux de l'extrait butanolique. Par exemple, la réaction à l'acétate mercurique, qui passe pour spécifique de l'acide malique, est positive dans les trois solutions aqueuses résultant de ce fractionnement.

Une technique de séparation de ces acides organiques plus spécifique que ne l'est le fractionnement plombique s'impose donc, et nous avons tenté la chromatographie des extraits sur colonne.

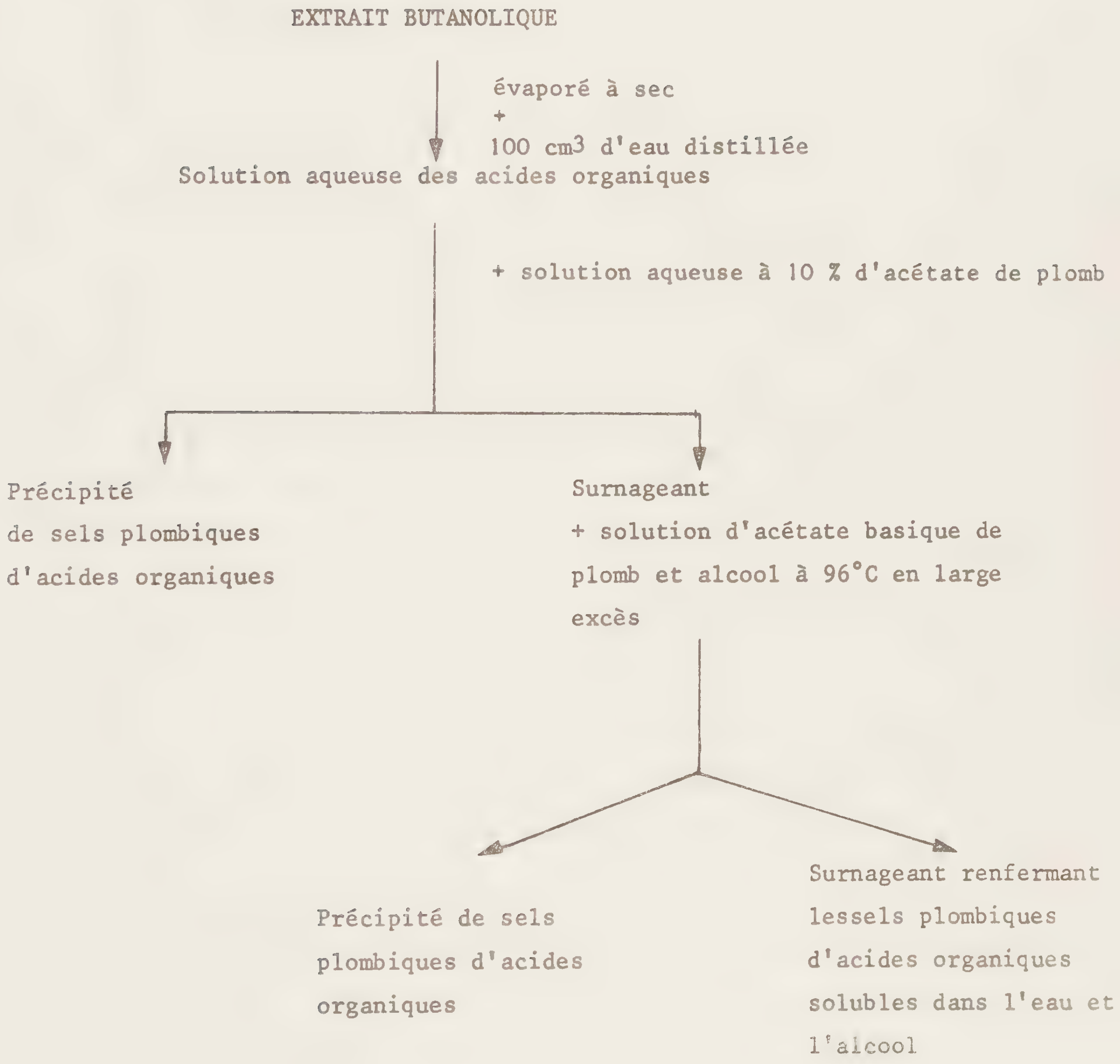



Tableau n° 10 : Méthode générale de fractionnement par les sels de plomb, d'une solution aqueuse d'acides organiques

### 3) Chromatographie sur colonne

#### a) Historique

Depuis les travaux de ISHERWOOD (1946), la chromatographie sur gel de silice a été utilisée par de nombreux auteurs pour la séparation et le dosage des acides organiques. On peut citer les travaux de KENNETH, DONALSON, TULANE et MARSHALL (1952), ceux de JOLCHINE (1956) qui a étudié les acides organiques de *Bryophyllum daigremontianum*, ainsi que ceux de RAVEUX et BOVE (1957), qui réalisant une étude critique des différentes méthodes publiées jusqu'à cette date, appliquent une technique personnelle, basée sur leurs nombreuses observations, à la détermination des acides organiques du tissu de Topinambour et des cultures de tissu du *Citrus*. Il faut également citer les travaux de STUZ et BURRIS (1951) et ceux de CARLE et ALQUIER-BOUFFARD (1965) qui utilisent comme support de la phase aqueuse acide, non plus le gel de silice, mais la celite ; la phase mobile étant dans les deux cas constituée par des mélanges solvants tels que le chloroforme et le (n-)butanol ou le chloroforme et l'alcool amylique primaire.

Afin de tenter la séparation des acides organiques de nos extraits, nous avons adopté la méthode décrite par JOLCHINE (1956) en y remplaçant toutefois le mélange éluant chloroforme-alcool butylique, qui risque d'estérifier de petites quantités d'acides organiques lors de leur passage lent le long de la colonne de chromatographie (BULEN, VARNER, BURRELL, 1952), par le mélange chlorure de méthylène-méthylisobutylcétone qui évite de tels phénomènes (SCOOT, 1955).

#### b) Mode opératoire

Le gel de silice est préparé, à partir d'acide silicique MALLINCKRODT, selon le procédé de BULEN, VARNER et BURRELL (1952)

8 g de silice sont mélangés intimement dans un mortier avec 5,5 $cm^3$ d'acide sulfurique 0,5 N. La poudre obtenue, mélangée à 40 $cm^3$ de chlorure de méthylène est alors versée dans une colonne de 20 cm de long et de 8 mm de diamètre supérieur, munie à sa base d'un robinet et à son sommet d'un rodage auquel peut s'adapter une ampoule à brome de 100 $cm^3$ de capacité. L'excès de liquide est poussé dans la colonne en réalisant à l'aide d'air comprimé une surpression de quelques millimètres de mercure, ce qui a pour effet de donner une colonne homogène.

0,5 $cm^3$ d'extrait sont alors mélangés rapidement à 1 g de silice sèche et transférés avec précaution sur la colonne de silice. On dispose sous la colonne un collecteur de fractions muni d'un dispositif de fractionnement à volume constant (2 $cm^3$).

Le développement et l'élution sont réalisés par des mélanges de chlorure de méthylène et de méthylisobutylcétone saturés d'eau à 2,5 % d'acide sulfurique. Les mélanges solvants employés sont les suivants :

- 100 $cm^3$ de chlorure de méthylène à 10 % en méthylisobutylcétone
- 100 $cm^3$ de chlorure de méthylène à 20 % en méthylisobutylcétone
- 100 $cm^3$ de chlorure de méthylène à 30 % en méthylisobutylcétone
- 200 $cm^3$ de chlorure de méthylène à 50 % en méthylisobutylcétone
- 100 $cm^3$ de chlorure de méthylène pur

La plupart des auteurs étudient chaque fraction en dosant leur acidité avec de la soude 0,01 N, en présence de rouge de phénol et d'une

solution à 1 % de laurylsulfonate de sodium, assurant à l'agitation un contact intime entre la phase aqueuse et la phase organique, puis comparent la courbe représentant la répartition de l'acidité en fonction des fractions à celle établie dans les mêmes conditions pour un mélange d'acides témoins (figure n°VII). Nous avons préféré analyser directement chaque fraction recueillie par chromatographie en couche mince. Pour cela, le solvant de migration est le toluène-formiate d'éthyle-acide formique, le révélateur est le réactif de SCHWEPPE dont la formule a été décrite page 33.

c) Résultats

Comme nous le montre la figure n°VIII, il s'avère très difficile de séparer de façon correcte les différents acides organiques contenus dans les extraits. D'autre part, les acides organiques isolés initialement à l'état pur semblent subir très rapidement des transformations qui aboutissent à la formation d'autres composés, ce qui se manifeste par l'apparition sur les chromatogrammes d'autres taches dont les Rf sont soit supérieurs soit inférieurs au Rf de la tache initiale.

d) Conclusion

La chromatographie sur colonne ne nous permettant pas de séparer rigoureusement et en quantité suffisante les différents acides organiques du bloc acide, ce qui nous aurait permis d'en déterminer la structure par les méthodes physiques, nous avons essayé de les identifier par chromatographie en couche mince.

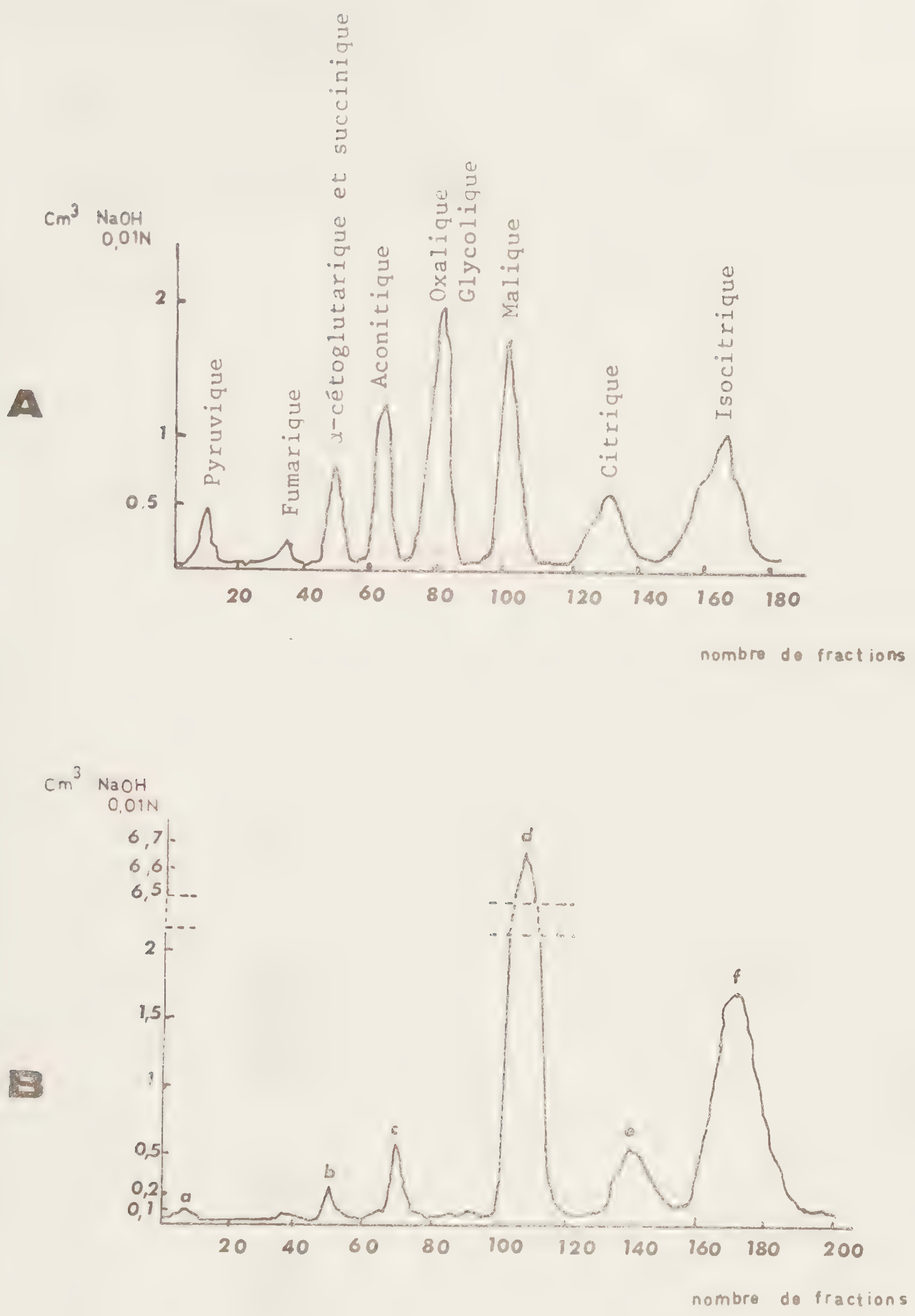



Figure n° VII : Analyse d'un mélange complexe d'acides organiques témoins (A) et d'acides retirés du *Bryophyllum daigremontianum*, séparés par chromatographie sur colonne de silice imprégnée d'acide sulfurique et dont les fractions sont titrées par la soude (d'après JOLCHINE)

**Conditions opératoires :**

Solvant de migration :
Toluène - formiate d'éthyle - acide formique
(5-4-1,V/V)
Révélateur : réactif de SCHWEPPE
Distance de migration : 15 cm

**Légende :**

1 - extrait soumis à la séparation
2 - fraction 21
(solvant : chlorure de méthylène à 10% en methylisobutylcétone)
3 - fraction 51
(solvant : chlorure de méthylène à 20% en methylisobutylcétone)
4 - fraction 68
(solvant : chlorure de méthylène à 30% en methylisobutylcétone)

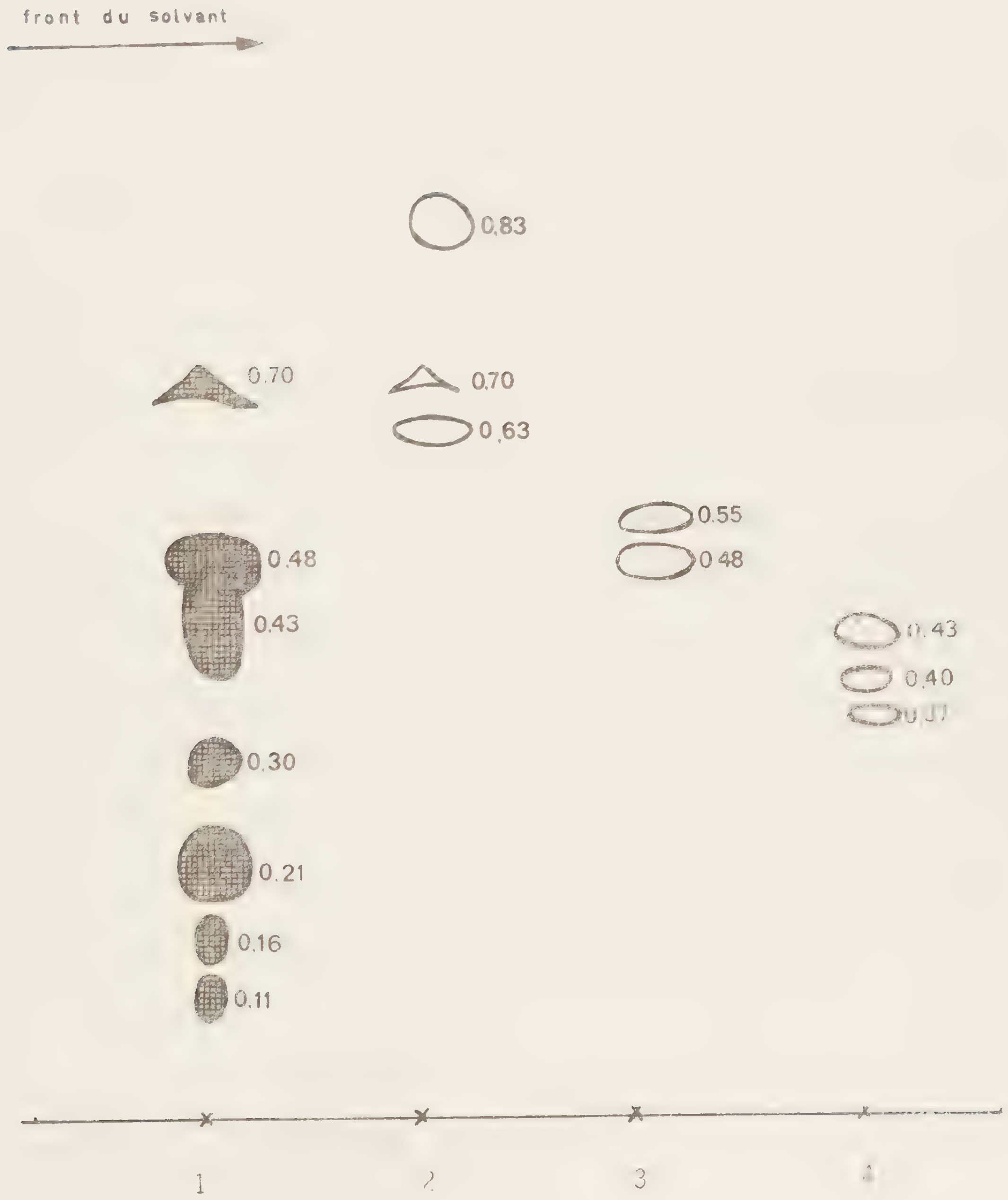



Figure n° VIII : Analyse par chromatographie en couche mince des différentes fractions obtenues par chromatographie sur colonne d'un extrait "acide" de *Cynara scolymus*.

4) <u>Séparation des acides organiques par chromatographie sur couche mince</u>

Il n'est pas possible de donner une analyse exhaustive des très nombreuses techniques proposées pour la séparation des acides organiques par chromatographie sur couche mince. Disons simplement que cette méthode est une transposition de la chromatographie sur colonne ou de la chromatographie sur papier, suivant que le support utilisé est la silice ou la poudre de cellulose.

Des phases stationnaires plus spéciales ont été également proposées, telles que les couches minces de polyéthylène glycol (KNAPPE et PETERI, 1962) ou un mélange de Kieselgel et de silice (MIYAZAKI, SUHARA, KOBAYASHI, 1969). Il faut également signaler que la chromatographie sur couche mince a été combinée à d'autres techniques telles que l'électrophorèse (NYGAARD, 1967).

Après avoir expérimenté plusieurs procédés, tels que la chromatographie bimentionnelle sur couche mince de cellulose (WILLIAM, MYERS, KUN-YEN HUANG, 1969) ou la chromatographie sur papier WAATMANN n° 1 par voie descendante en solvant acide (n-butanol-acide formique 25 N-eau distillée 75-15-10, V/V), nous avons retenu la chromatographie sur couche mince de Kieselgel dans les systèmes solvants déjà utilisés lors de l'identification de l'acide hydroxyméthylacrylique extrait après hydrolyse alcaline ou acide de la cynaropicrine.

a) Chromatographie des composés dans le solvant acide

(1) Conditions opératoires

α. Matériel

- Support : plaques de verre de 0,20 x 0,20 cm
- Adsorbant : Kieselgel G MERCK, épaisseur : 0,25 mm
- Solvant de développement ;

  Solvant A :

  Toluène-formiate d'éthyle-acide formique (5-4-1, V/V)
- Substances déposées :

  Solutions témoins à 1 % dans l'alcool méthylique des acides purs (MERCK) suivants :

  Acides citrique, glycérique, glycolique, fumarique, lactique, malique, succinique et tartrique

  Dépôt : 10 µl
- Liqueurs extractives

  Dépôt : 10 µl

La migration est effectuée à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

β. Révélateurs

☐ Révélateurs généraux

Ce sont sensiblement les mêmes que ceux utilisés pour révéler l'acide hydroxyméthylacrylique

- Réactif de SCHWEPPE (1959) : révélateur de la fonction acide.
- Réactif phosphomolybdique (KRITCHEVSKY et KIRK, 1952) : révélateur des fonctions réductrices.
- Réactif au bleu de bromophénol (PETROWITZ et PASTUSKA, 1962) : Après passage des plaques 1 heure à l'étuve à 60°C afin d'éliminer l'acide formique, pulvériser ce réactif (solution alcoolique à 0,04 % de bleu de bromophénol). Il apparaît alors des taches jaunes sur fond bleu.

☐ Révélateurs plus spécifiques

Afin de préciser sur plaque la nature de ces constituants acides, nous avons alors utilisé pour la révélation des réactifs particuliers plus spécifiques de ces acides. Nous obtenons ainsi, soit des fluorescences différentes, soit des colorations, permettant d'identifier avec plus de sécurité des acides de Rf voisins, sinon identiques.

- $R_1$ : Réactif à l'acide chromotropique (BEROZA, 1963)

Préparation du réactif (voir page 34).

Après pulvérisation et chauffage à 110°C pendant 30 minutes, la lecture des plaques est faite à la lumière visible (coloration jaune vert et bleu) puis en U.V. à 365 nm (tache fluorescente).

- $R_2$ : Réactif à la para-nitraniline diazotée (SWAIN, 1953)

Préparation du réactif (voir page 34).

La pulvérisation est suivie de l'apparition de taches rouges violacées.

- $R_3$ : Réactif à l'orcinol sulfurique (HUMMEL, 1949)

Mélanger extemporanément (1-1, V/V), une solution alcoolique à 0,2 % de dihydroxy 3-5 toluène et une solution d'acide sulfurique diluée au 1/5 dans l'eau. Après pulvérisation et chauffage 10 minutes à 110°C, la lecture est faite en U.V. (taches fluorescentes).

- $R_4$ : Réactif au naphtorésorcinol sulfurique (STAHL, 1969)

Mélange extemporané (1-1, V/V) d'une solution alcoolique à

0,2 % de naphtorésorcinol et d'une solution d'acide sulfurique diluée au 1/5 dans l'eau. Pulvériser et chauffer 10 minutes à 110°C. La lecture est faite en U.V. (taches fluorescentes).

- $R_5$ : Réactif à la vanilline sulfurique de HAUSSLER (in GRIGNARD, 1945)

Pulvériser tout d'abord une solution alcoolique à 1 % de vanilline. Après séchage à l'air, pulvériser une solution d'acide sulfurique diluée au 1/5 dans l'eau. Placer alors les plaques à l'étuve à 110°C jusqu'à apparition de taches bleu violacées.

- $R_6$ : Réaction de FURTH et CASARES (in GRIGNARD, 1945)

La plaque chauffée vers 80°C, est arrosée avec la solution suivante : anhydride acétique-pyridine (1-5, V/V). Une coloration rose opéra est obtenue immédiatement.

2) Résultats

α. Après révélation par les réactifs généraux

☐ Bloc acide obtenu sans hydrolyse de la plante (extraction eau et méthanol légèrement acide)

Les extraits d'Artichaut ainsi obtenus, fournissent des chromatogrammes sur lesquels figurent 7 taches. En comparant les Rf de ces taches avec ceux d'acides organiques témoins chromatographiés dans les mêmes conditions (figure n°IX ), il est probable que les extraits contiennent les acides citrique, malique et glycolique dont la présence a été déjà entrevue par les réactions colorées effectuées en tube. Il est

Conditions opératoires :

Solvant de migration :
Toluéne-formiate d'éthyle-acide formique
(5-4-1, V/V)
Révélateur : réactif de SCHWEPPE
Distance de migration : 15 cm

Acides organiques

1 - tartrique
2 - glycérique
3 - citrique
4 - malique
5 - glycolique
6 - extrait butanolique d'Artichaut
7 - lactique
8 - succinique
9 - fumarique

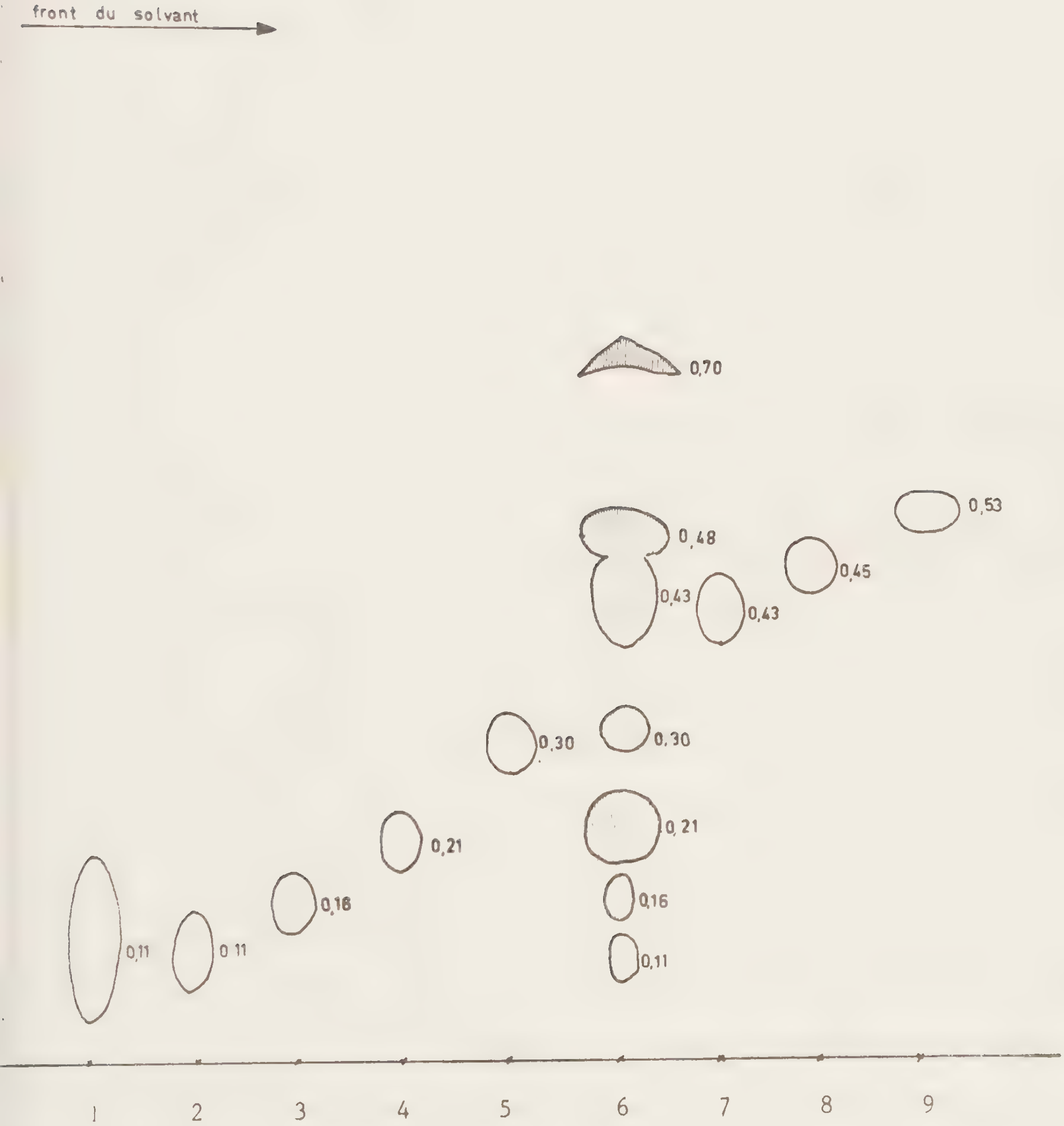



Figure n° IX : Chromatographie sur couche mince des différents acides obtenus par extraction directe de l'Artichaut *(Cynara scolymus L.)*

par contre difficile de trancher entre les acides glycérique et tartrique d'une part, et les acides lactique, fumarique, hydroxyméthylacrylique et succinique d'autre part, dont les Rf sont voisins.

☐ Bloc acide obtenu après hydrolyses alcalines et acides de la plante (soude N et acide sulfurique 0,5 N)

Si l'on retrouve les mêmes taches après chromatographie des extraits dans des conditions analogues aux précédentes, il faut signaler que le réactif de SCHWEPPE révèle deux autres taches de Rf 0,58 et 0,79. D'autre part, pour des dépôts identiques (10 µl), les taches sont beaucoup plus intenses que dans les cas précédents.

β. Après révélation par les réactifs particuliers

☐ Bloc acide obtenu sans hydrolyse de la plante

Les résultats concernant les acides de référence sont réunis dans le tableau n° 11 .

Quant aux extraits méthanoliques, il fournissent avec ces différents réactifs les résultats suivants :

Réactif R 1 : Une tache (Rf = 0,21) de coloration vert jaune et de fluorescence jaune intense en lumière U.V. (longueur d'onde : 365 nm), analogue à celle donnée par le témoin d'acide malique (Rf = 0,21) ; ainsi que deux autres taches dont l'une a le même Rf (0,30) et la même coloration bleue que celle donnée par l'acide glycolique de référence, tandis que l'autre de Rf : 0,50 et de coloration brun orangée correspond, comme nous l'avons vu précédemment, à l'acide hydroxyméthylacrylique.

| Rf | ACIDES TEMOINS | REVELATEURS PARTICULIERS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R. 1 | R. 2 | R. 3 | R. 4 | R. 5 | R. 6 |
| 0,11 | Tartrique | - | - | - | - | - | col. verte |
| 0,11 | Glycérique | - | - | - | - | - | - |
| 0,16 | Citrique | - | - | - | - | col. bleu violacé | col. rose |
| 0,21 | Malique | col. vert jaune fluo. jaune intense | col. rouge violacé | fluo. bleue intense | fluo. bleue intense | - | - |
| 0,30 | Glycolique | col. bleue | - | - | - | - | - |
| 0,43 | Lactique | - | - | - | - | - | - |
| 0,45 | Succinique | - | - | - | - | - | - |
| 0,53 | Fumarique | - | col. rose | - | - | - | - |

<u>Tableau n° 11</u> : Colorations différentielles de quelques acides organiques utilisables en chromatographie sur couche mince

Réactif R 2 : Outre la tache rouge orangé de Rf = 0,50 identifiable à l'acide hydroxyméthylacrylique, une tache de Rf : 0,2I et de coloration rouge violacé semblable à celle donnée par l'acide malique témoin, apparaît sur le chromatogramme. Par contre, l'acide fumarique qui donne avec ce réactif une coloration rose, ne semble pas être présent dans les extraits.

Réactif R 3 et R 4 : Dans les deux cas, une fluorescence bleue intense à 365 nm identique à celle donnée par l'acide malique témoin, nous permet de confirmer la présence de cet acide dans les extraits.

Réactif R 5 et R 6 : Ces deux réactifs révèlent le premier en bleu violacé, le second en rose foncé, une tache identifiable à l'acide citrique. Par contre, aucune tache verte correspondant à l'acide tartrique n'apparait sur le chromatogramme après pulvérisation du réactif R 5. Il est donc probable que la tache se situant au même Rf que l'acide tartrique (Rf : 0,11) est l'acide glycérique.

☐ Bloc acide extrait après hydrolyse alcaline ou acide de la plante.

Après révélation par les réactifs particuliers, nous retrouvons les taches identifiables aux acides malique, citrique, glycolique ainsi qu'à l'acide hydroxyméthylacrylique. Cependant, après pulvérisation par le réactif à l'acide chromotropique (R 1), il apparaît sur les chromatogrammes, outre les taches de Rf 0,21 ; 0,30 et 0,50 correspondant respectivement aux acides malique,glycolique et hydroxyméthylacrylique purs, trois autres taches dont deux (Rf = 0,55 et 0,79) ont la

même coloration jaune vert et la même fluorescence que l'acide malique témoin hydrolysé, tandis que la troisième (Rf = 0,64) se révèle en bleu comme l'acide glycolique hydrolysé (figure n° **X** ).

(3) Conclusions

Il nous a été possible, grâce à l'emploi de réactifs plus particuliers et spécifiques de chacun des acides, fournissant soit des colorations soit des fluorescences différentes, d'identifier dans les extraits les acides citrique, glycolique, glycérique, hydroxyméthyl-acrylique et malique.

Reste à démontrer la présence des acides lactique et succinique qui, outre des Rf trop rapprochés dans ce système solvant, ne donnent aucune coloration ou fluorescence avec les réactifs précédemment cités.

Pour cela, nous avons tenté de chromatographier les acides organiques non plus dans un solvant acide, mais dans des solvants alcalins.

b) Chromatographie des composés dans les solvants alcalins.

(1) Conditions opératoires

α. Matériel

- Plaques de verre de 0,20 x 0,20 cm
- Adsorbant : Kieselgel G (MERCK), épaisseur : 0,25 mm
- Solvants de migration

  Solvant I :

  Ethanol-chloroforme-ammoniaque à 25 % (68-15-17, V/V)

Conditions opératoires :

Solvant de migration :
Toluène-formiate d'éthyle-acide formique (5-4-1, V/V)
Révélateur : acide chromotropique
Distance de migration : 15 cm

1 - acide hydroxyméthylacrylique
2 - acide glycolique témoin
3 - bloc acide extrait après hydrolyse alcaline ou acide de la plante
4 - acide malique témoin

Figure n° X : Révélations particulières par le jeu de réactifs fournissant des séries de coloration avec différentes taches obtenues par chromatographie sur couche mince d'un bloc acide d'Artichaut hydrolysé en milieu acide (0,5 N) ou alcalin (1 N)

Colorations

bleu

jaune vert

rouge

fluorescence jaune

Solvant II :

Ethanol-tétrahydrofurane-ammoniaque à 25 % (56-22-22, V/V)

- Substances déposées

Solutions à 1 % dans l'alcool méthylique des acides citrique, glycérique, glycolique, fumarique, lactique, malique et succinique

- Liqueurs extractives

Dépôt : 10 µl

La migration est effectuée à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

β. Révélateur

Il est constitué par une solution alcoolique à 0,1 % de dichloro-2,6 phénolindophénol (PASSERA, PEDROTI et FERRARI, 1964). Après pulvérisation de ce réactif utilisé comme indicateur de pH, il apparaît aussitôt sur les plaques des taches roses.

(2) Résultats

Les figures n° XI et XII donnent les Rf des substances témoins dans les deux solvants ainsi que les Rf des différentes taches retrouvées dans les extraits méthanoliques.

Ainsi, grâce à l'utilisation comparative de deux systèmes de solvants alcalins, l'on peut d'une part confirmer la présence, dans les extraits, des acides déjà caractérisés et d'autre part, identifier outre la présence dans ceux-ci d'acide lactique et succinique qui cette fois ont des Rf très différents, une très faible quantité d'acide fumarique.

(3) Conclusions

Il nous a été possible jusqu'ici de déceler la présence

Conditions opératoires :

Solvant de migration :
solvant I
Ethanol-chloroforme-
ammoniaque à 25 %
(68-14-17, V/V)
Révélateur : dichlorophénol-
indophénol
Distance de migration : 15 cm

Acides organiques :

1 - glycérique
2 - malique
3 - fumarique
4 - succinique
5 - extrait butanolique d'Artichaut
6 - citrique
7 - glycolique
8 - lactique
9 - hydroxyméthylacrylique

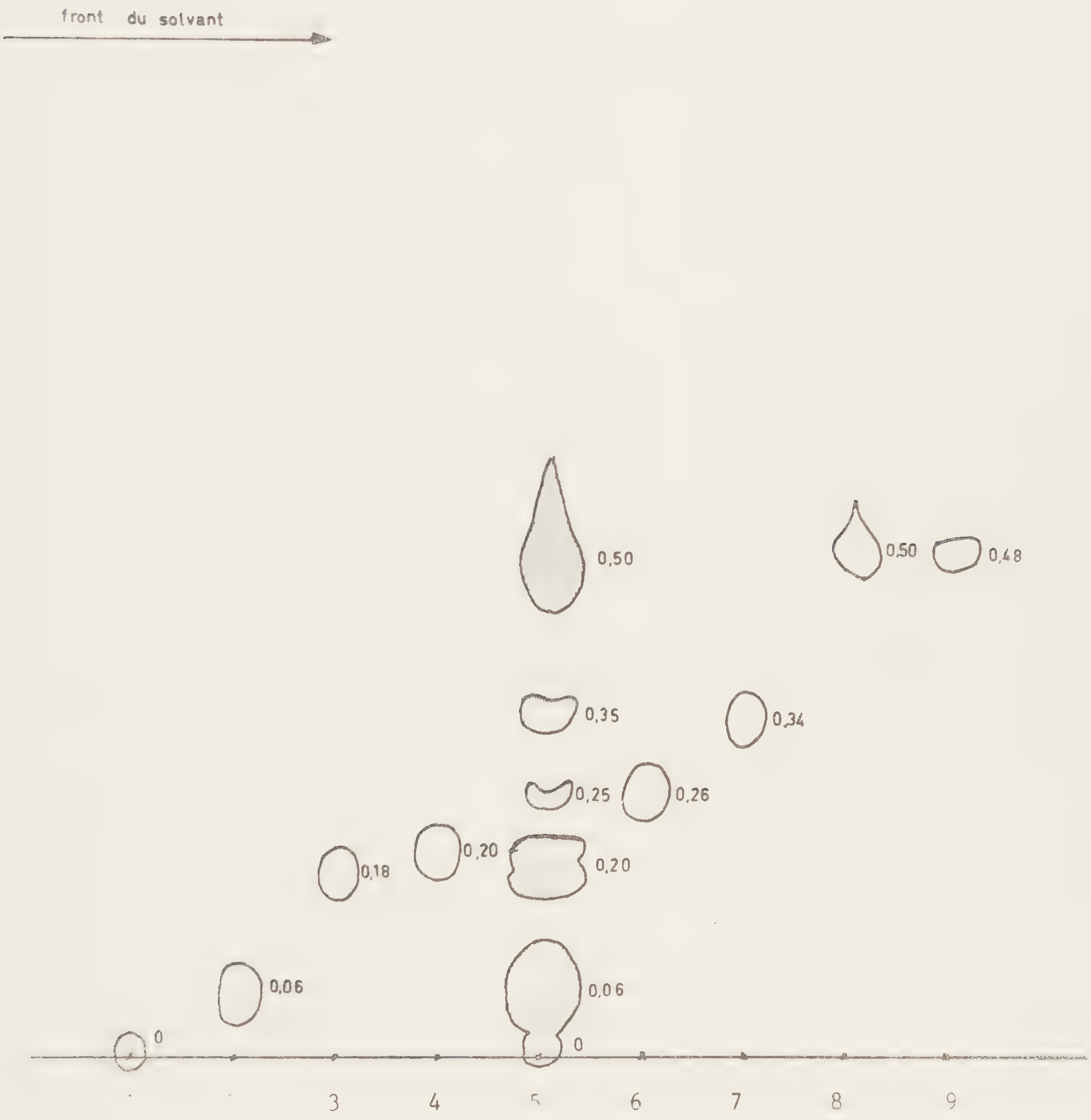



Figure n° XI : Chromatogramme obtenu après migration dans le solvant alcalin (I) du bloc acide de l'Artichaut non hydrolysé

Conditions opératoires :

Solvant de migration :
solvant II
Ethanol-tétrahydrofuranne-
ammoniaque à 25 %
(56-22-22, V/V)
Révélateur : dichlorophénol-
indophénol
Distance de migration : 15 cm

Acides organiques

1 - glycérique
2 - malique
3 - fumarique
4 - succinique
5 - extrait butanolique d'Artichaut
6 - citrique
7 - glycolique
8 - lactique
9 - hydroxyméthylacrylique

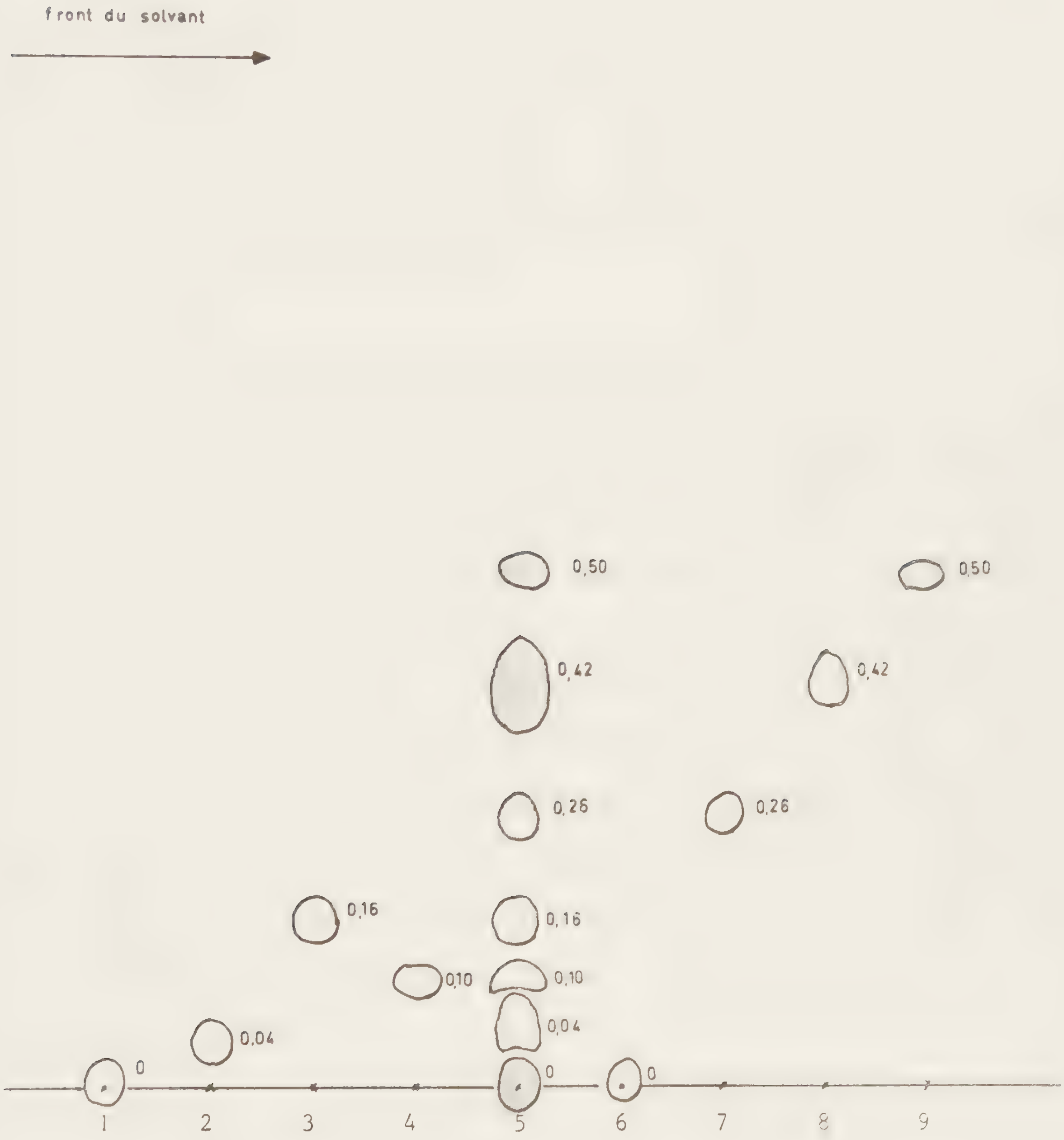



Figure n° XII : Chromatogramme obtenu après migration dans le solvant alcalin (II) du bloc acide de l'Artichaut non hydrolysé

des acides glycolique, glycérique, malique et lactique, déjà signalés par BALANSARD (1952) et de mettre en évidence la présence des acides citrique, fumarique, succinique et hydroxyméthylacrylique.

Cependant, afin de confirmer par une deuxième méthode, pour plus de sécurité, la présence de ces composés et de poursuivre la mise au point des techniques analytiques de séparation, d'identification et de dosage des acides alcools, il fallait s'adresser à d'autres moyens d'investigations. Nous avons donc eu alors recours à la chromatographie en phase vapeur.

### 5) Chromatographie en phase vapeur

#### a) Préparation et chromatographie des acides témoins

Comme nous l'avons signalé lors de l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique, les acides organiques doivent être transformés en dérivés plus volatils pour être analysés par chromatographie en phase vapeur. Nous avons donc tenté de préparer les dérivés triméthylsilylés puis les dérivés méthylés des acides témoins suivants : acides citrique, glycérique, glycolique, fumarique, lactique, malique et succinique (commercialisés par les laboratoires MERCK), qui constituent semble-t-il le bloc acide des extraits butanoliques d'Artichaut, et de les soumettre à l'analyse.

##### (1) Préparation des dérivés triméthylsilylés

α. Mode opératoire

10 mg de chaque acide sont dissous dans 1 $cm^3$ de pyridine

anhydre. Après dissolution totale du produit, on ajoute 0,2 $cm^3$ de bis-triméthylsilylacétamide ou 0,1 $cm^3$ de triméthylchlorosilane et 0,2 $cm^3$ d'hexaméthyldisilazane. Le mélange réactionnel abandonné 12 heures à la température du laboratoire peut être alors injecté directement dans l'appareil.

L'analyse par chromatographie en phase vapeur des dérivés triméthylsilylés des différents acides témoins est effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées lors de l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique (voir page 40).

β. Résultats

Exception faite pour l'acide glycérique qui fournit trois pics d'inégale importance mais dont nous ne retiendrons par la suite que le principal (figure n° XIII), chaque acide ainsi traité ne donne qu'un pic dont les temps de rétention figurent au tableau n° 12.

(2) Préparation des dérivés méthylés des acides témoins

Ils ont été préparés en faisant agir sur les acides libres soit le méthanol trifluorure de bore, soit le diazométhane.

α. Méthode d'estérification par le méthanol trifluorure de bore

10 mg de chaque acide témoin sont dissous dans 1 $cm^3$ de solution méthanolique renfermant 14 % de trifluorure de bore. Les mélanges réactionnels abandonnés à la température ambiante pendant 12 heures sont alors soumis à l'analyse.

β. Méthode d'estérification par le diazométhane

A des solutions méthanoliques (1$cm^3$) renfermant chacune 10 mg

<u>Conditions opératoires</u> :

Colonne : 5 % SE - 30
Gaz vecteur : azote (26 $cm^3$/mn)
Température de l'injecteur : 275°C
Température du détecteur : 225°C
Programme de température : 110°C-250°C
(15°C/mn)
Vitesse de déroulement du papier : 12 mm/mn
Volume injecté : 2 µl
Atténuation : 1/128
Détecteur : ionisation de flamme

<u>Figure n° XIII</u> : Analyse par chromatographie en phase vapeur de l'acide glycolique du commerce après transformation en dérivé triméthylsilylé

| DERIVES SILYLES | TEMPERATURE DE COLONNE | TEMPS DE RETENTION |
|---|---|---|
| Glycolique | 130° | 1'20" |
| Lactique | 134° | 1'40" |
| Glycérique | 138° | 1'55" |
| H.M.A.* | 155° | 3' |
| Succinique | 160° | 3'25" |
| Fumarique | 166° | 3'45" |
| Malique | 187° | 5'05" |
| Citrique | 228° | 7'55" |

* Hydroxyméthylacrylique

Tableau n°12 : Température de colonne et temps de rétention des acides organiques témoins sous forme de dérivés triméthylsilylés

d'un acide témoin, refroidies à 20°C dans un bain de glace et d'acétone, on ajoute doucement une solution ethérée de diazométhane refroidie à - 20°C jusqu'à ce qu'un léger excès colore le milieu en jaune. Les mélanges réactionnels sont alors évaporés à sec sous un courant d' azote et à très basse température pour éviter toute perte en esters méthyliques les plus volatils. Une fraction aliquote de chaque résidu, repris par 1 $cm^3$ de méthanol sera injectée dans l'appareil de chromatographie en phase vapeur.

γ. Analyse par chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques des acides témoins

□ Conditions opératoires

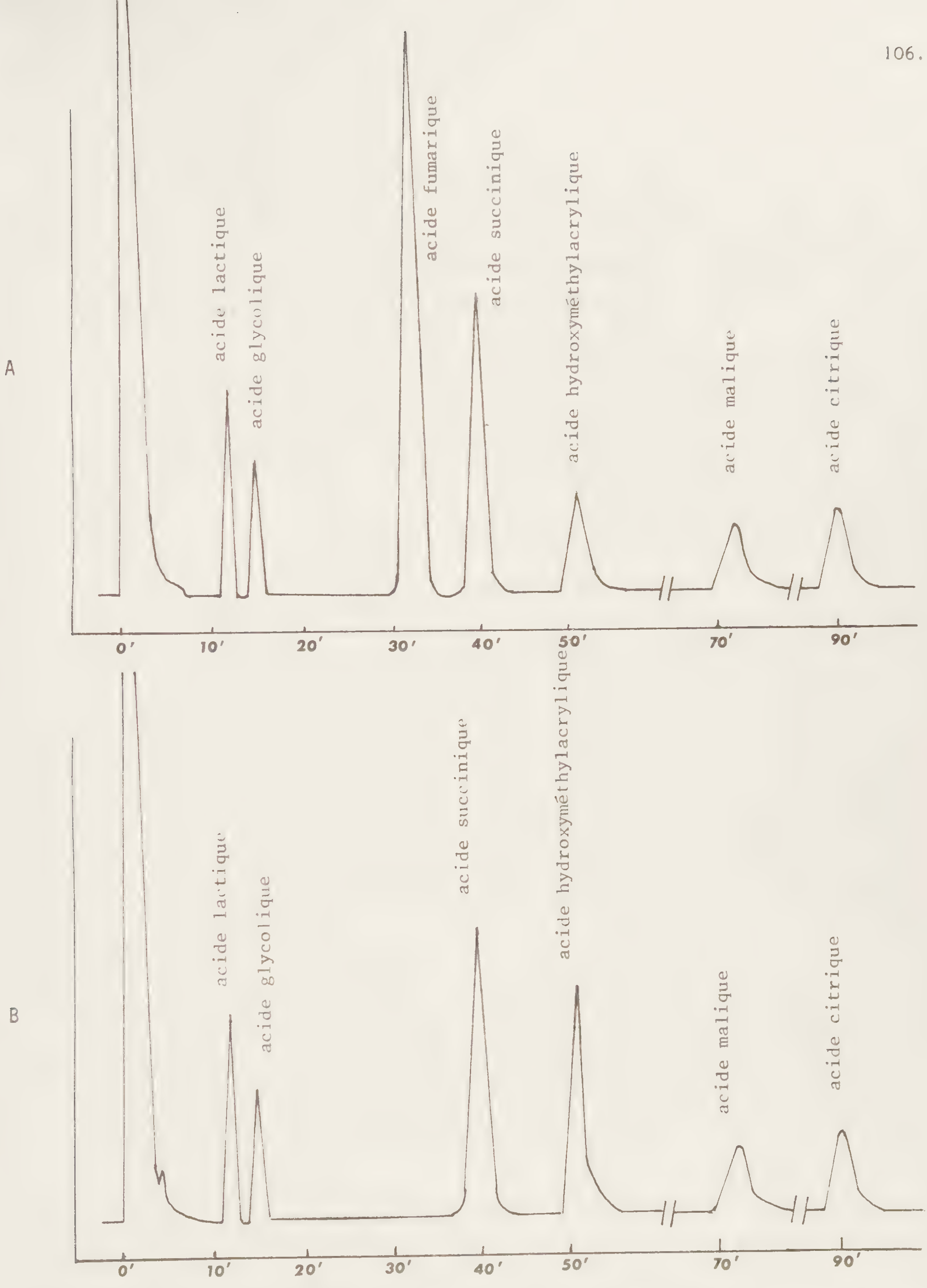
Les conditions opératoires sont strictement identiques à celles utilisées lors de l'étude de l'ester méthylique de l'acide hydroxyméthylacrylique (voir page 43).

□ Résultats

A la lecture du tableau n° 13 et de la figure n° XIV, nous constatons que les deux méthodes d'estérification peuvent être indifféremment employées pour l'analyse qualitative des acides citrique, glycolique, lactique, malique et succinique. Il n'en est pas de même pour l'acide fumarique. En effet, cet acide traité par le diazométhane à - 20°C, semble se transformer très rapidement en un dérivé de la pyrazoline (KEOWN et READ, 1965), qui dans les conditions opératoires choisies ne peut plus sortir de la colonne chromatographique. Par contre, s'il est traité par le méthanol trifluorure de bore, cet acide donne un pic dont le temps de rétention figure au tableau n° 13. Il faut encore signaler que, quelle que soit la méthode d'estérification, l'acide

| ACIDES | METHODE D'ESTERIFICATION | | TEMPS DE RETENTION DU PIC |
|---|---|---|---|
| | Méthanol trifluorure de bore | Diazométhane | |
| lactique | + | + | 12' |
| glycolique | + | + | 15' |
| fumarique | + | 0 | 32' |
| succinique | + | + | 40' |
| hydroxyméthylacrylique | ± | + | 52' |
| malique | + | + | 72' |
| citrique | + | + | 90' |

Tableau n° 13 : Différents types d'estérification des acides organiques permettant leur bonne mise en évidence par chromatographie en phase vapeur




<u>Figure n° XIV</u> : Comparaison des chromatogrammes obtenus après estérification d'un mélange d'acides organiques témoins existant dans l'Artichaut selon que l'on emploie le méthanol trifluorure de bore (A) ou le diazométhane (B) comme agent de méthylation

glycérique semble avoir un temps de rétention très long qui ne nous permet plus de l'étudier dans les conditions opératoires requises pour séparer d'une façon correcte les acides témoins que nous venons d'examiner ainsi que l'acide hydroxyméthylacrylique.

Son intérêt pharmacologique discret ne nous a pas incité à poursuivre plus avant sa détermination par cette technique, étant données les complications que cela aurait entraîné.

b) Préparation et analyse des échantillons d'Artichaut

(1) Dérivés triméthylsilylés

Les extraits butanoliques provenant de l'extraction de 20 g de plante par l'eau neutre, acide ou alcaline (hydrolyses) ainsi que par le méthanol légèrement acide sont évaporés à sec, puis totalement déshydratés pendant 48 heures sous vide phosphorique. Les acides organiques contenus dans le résidu ainsi obtenu sont dissous dans 1 $cm^3$ de pyridine anhydre. Le mélange est alors traité par les réactifs de silylation, puis injecté dans l'appareil de chromatographie en phase vapeur.

Dans ces conditions, nous obtenons pour tous les extraits huit pics dont sept d'entre eux ont des temps de rétention identiques à ceux des témoins précités tandis que le huitième correspond à l'acide hydroxyméthylacrylique (figure n° XV).

(2) Dérivés méthylés

Les résidus obtenus par les mêmes méthodes d'extraction, desséchés sous vide phosphorique, sont traités par le méthanol trifluorure de bore qui permet l'estérification de l'acide fumarique alors que le

Conditions opératoires :

Colonne : 5 % SE - 30
Gaz vecteur : azote (26 $cm^3$/mn)
Température de l'injecteur : 275°C
Température du détecteur : 225°C
Programme de température : 110°C-250°C (15°C/mn)
Vitesse de déroulement du papier : 12 mm/mn
Volume injecté : 2 µl
Atténuation : 1/128
Détecteur : ionisation de flamme

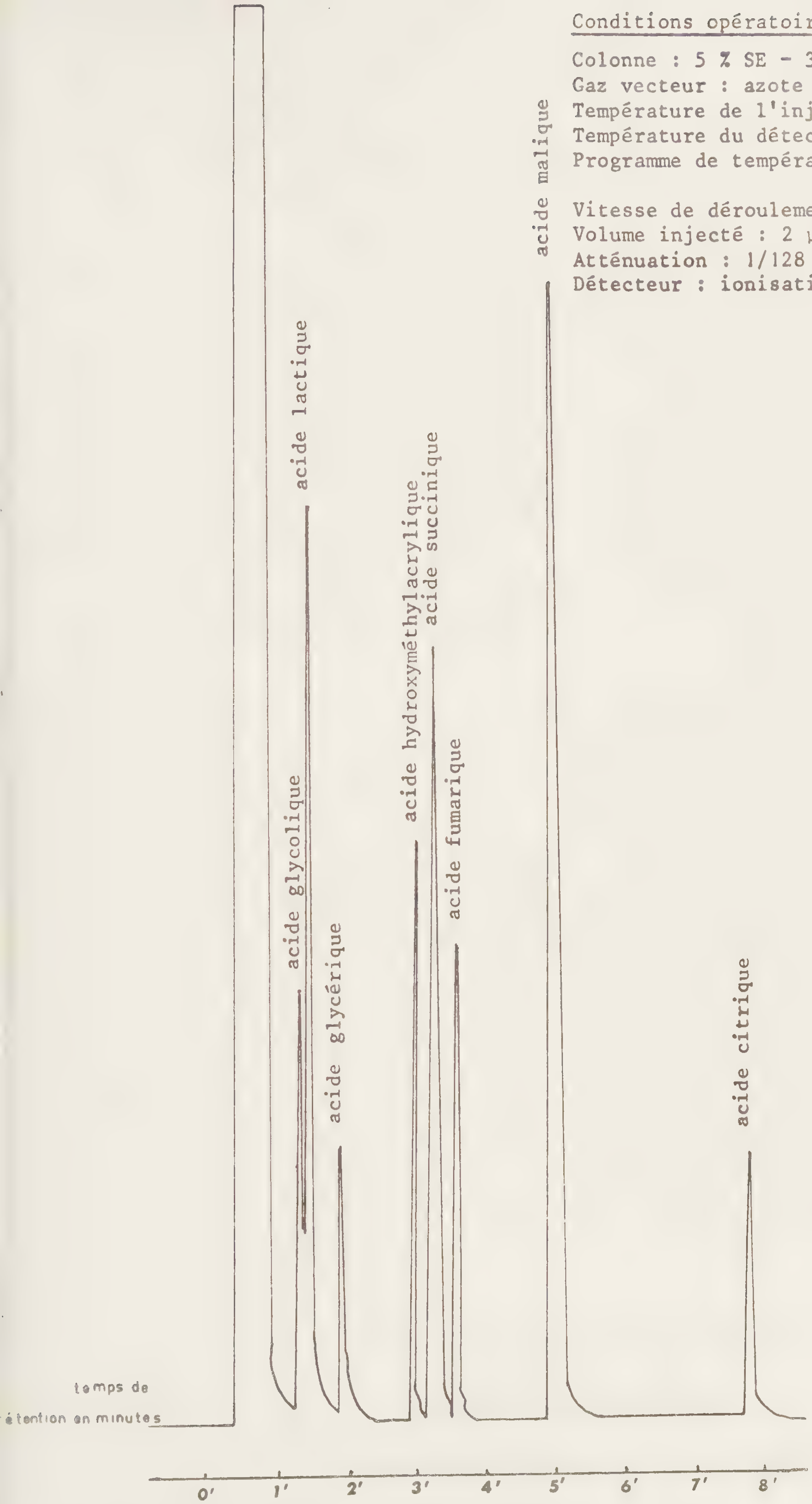



Figure n° XV : Chromatographie obtenue avec un extrait acide d'Artichaut après transformation des acides en dérivés triméthylsilylés

diazométhane par exemple est impuissant dans ce cas particulier.

Après injection des mélanges, on retrouve bien les pics correspondant aux acides lactique, glycolique, succinique, malique et fumarique. Cependant, il est noté que les chromatogrammes obtenus par cette technique, correspondant à l'injection des extraits résultant des hydrolyses acide et alcaline sont toujours plus complexes que ceux provenant de la plante non hydrolysée (figure n° XVI ), ce qui n'est pas étonnant puisque les hydrolyses dégradent une partie des acides malique et glycolique qui fournissent ainsi des composés interférant dans les déterminations.

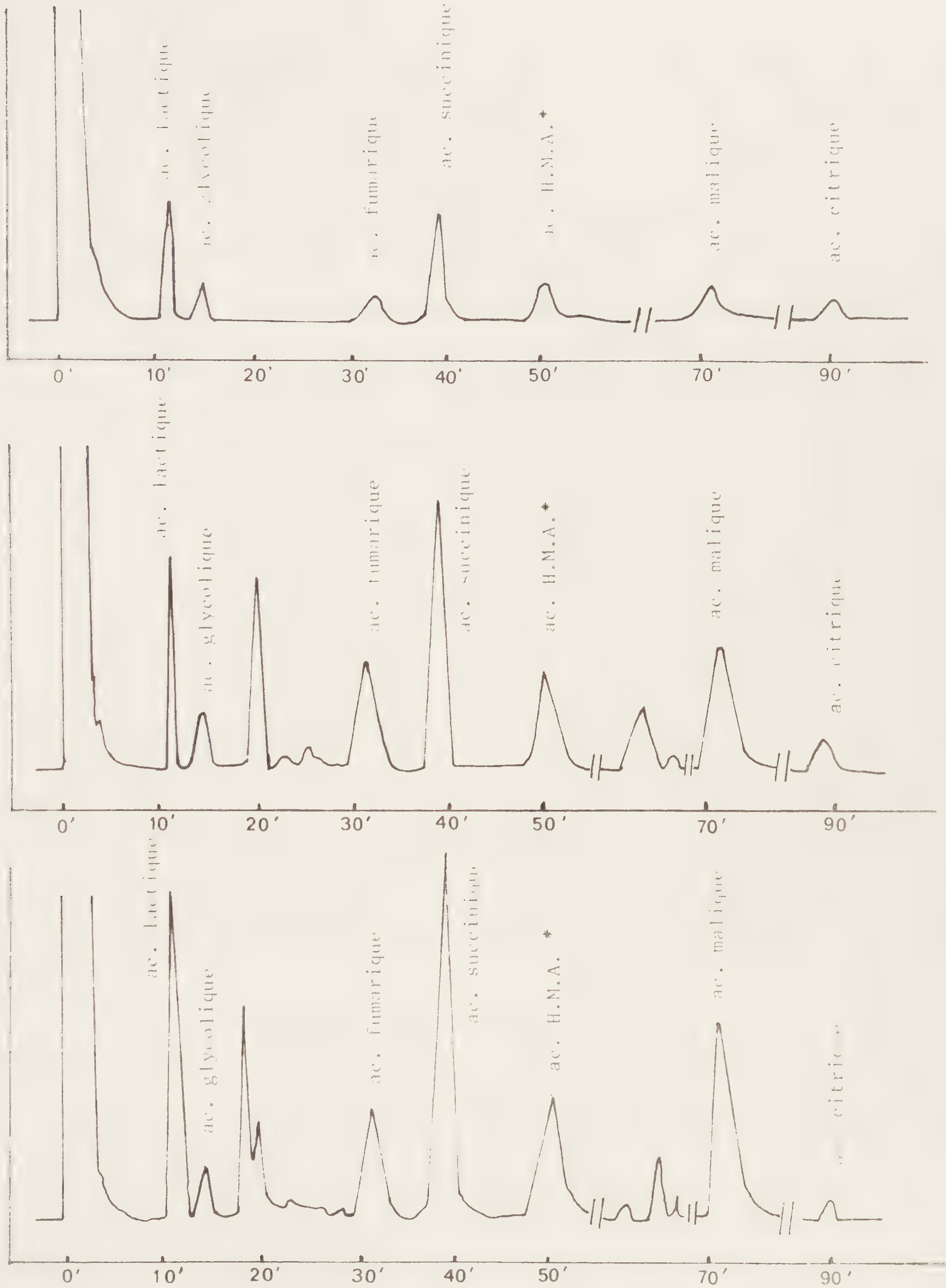
B - Dosage des acides organiques contenus dans les extraits d'Artichaut obtenus après hydrolyses acide et alcaline de la plante

Si la mise en oeuvre des résines échangeuses d'ions paraît constituer d'emblée le procédé de choix pour la purification d'un bloc acide provenant du matériel végétal, cette méthode nécessite l'emploi de solutions de soude de titre élevé pour l'élution. Il reste dans ce cas, le risque énorme de provoquer la transformation des acides les plus fragiles, fait que nous avons déjà constaté lors du passage des extraits sur colonne de silice imprégnée d'acide sulfurique. Nous nous sommes donc adressés, dans un premier temps, à la chromatographie en phase gazeuse.

1) Chromatographie en phase vapeur

a) Conditions opératoires

Si la méthode d'estérification par le méthanol trifluorure de




* H.M.A. = acide hydroxyméthylacrylique

Figure n° XVI : Aspects des enregistrements obtenus en chromatographie en phase vapeur du bloc "acide" obtenu sans hydrolyse (A), après hydrolyses alcaline (B) ou acide (C) des feuilles d'Artichaut.

bore ne permet plus le dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique, elle semble par contre la mieux adaptée pour la quantification des autres acides organiques présents dans les extraits d'Artichaut. En effet, des gammes étalons, réalisées en traitant par le méthanol trifluorure de bore des quantités croissantes des acides lactique, succinique, malique et fumarique, nous ont permis de vérifier la régularité de l'estérification et la linéarité de la réponse du détecteur pour les zones de concentration étudiées. Par contre, pour une même quantité injectée, la surface du pic chromatographique varie énormément avec la nature de l'ester d'acide organique analysé (figures n° XVII et XVIII). Ce phénomène déjà signalé par MALZIAK (1966) semble en accord avec le degré d'oxygénation des esters ; en effet, plus l'ester est oxygéné et moins le détecteur est sensible, ce qui est d'ailleurs en parfait accord avec ce que l'on sait des mécanismes de l'ionisation des molécules organiques dans une flamme. Ainsi, chaque fois que le dosage des différents acides organiques contenus dans les extraits d'Artichaut a été tenté, nous avons systématiquement comparé les surfaces des pics obtenus à celles fournies par des gammes étalons fraîchement préparées et traitées dans les mêmes conditions des acides correspondants.

b) Résultats

Les teneurs en acides lactique, succinique, fumarique et malique extraits après hydrolyse alcaline et acide de 20 g de feuilles sèches d'Artichaut sont reportées dans le tableau n° 14 . Par contre, la faible réponse du détecteur pour l'ester méthylique de l'acide citrique, ne nous a pas permis d'obtenir un pic d'une surface suffisante

Figure n° XVII : Relation entre les surfaces des pics chromatographiques appréciés par un détecteur à ionisation de flamme et les quantités croissantes des acides lactique, succinique, fumarique soumises à la méthylation par le méthanol trifluorure de bore.

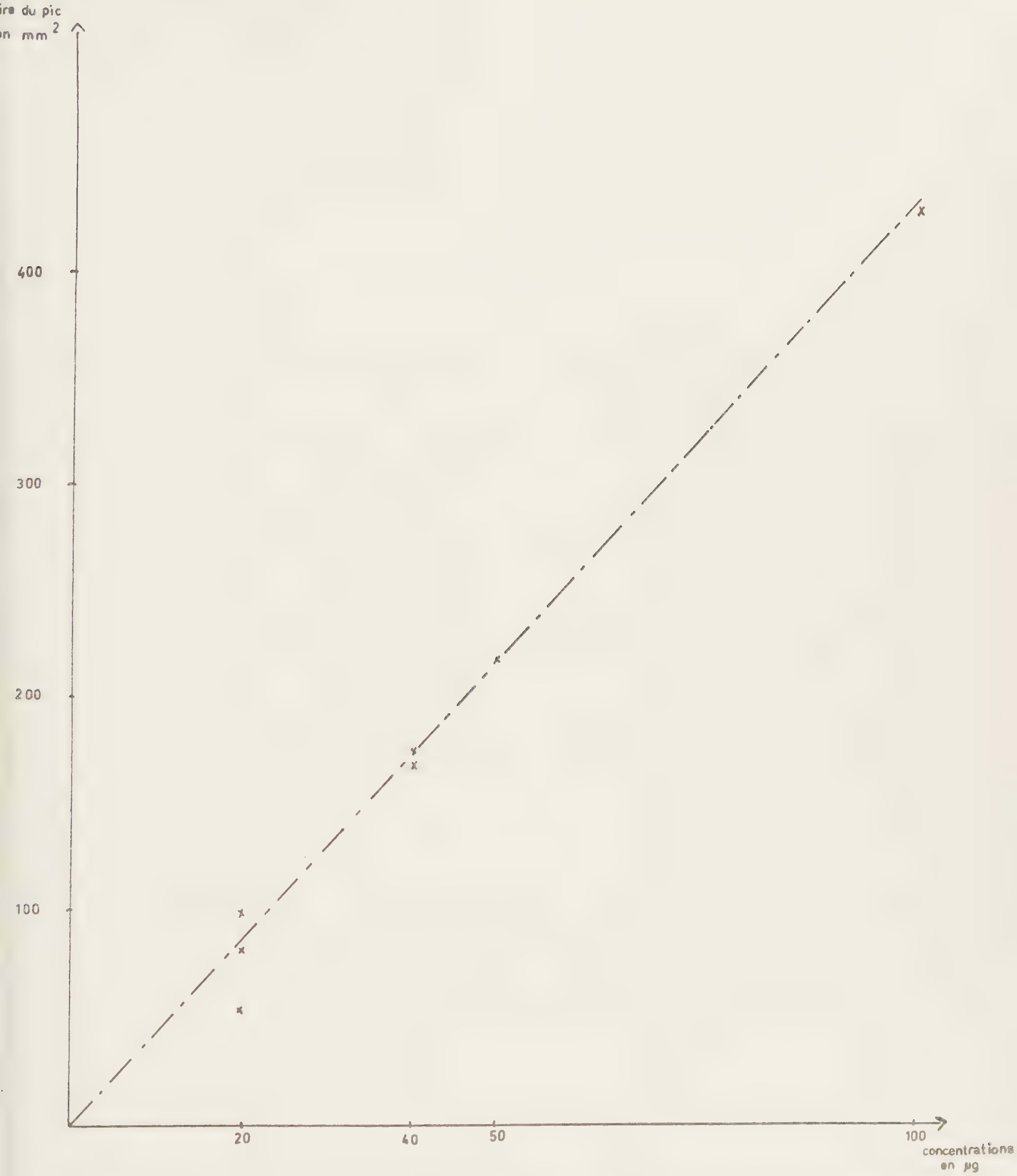



Figure n°XVIII: Relation entre les surfaces des pics chromatographiques appréciés par un détecteur à ionisation de flamme et les quantités croissantes d'acide malique soumises à l'estérification par le méthanol trifluorure de bore.

| ACIDES | EXTRACTION APRES HYDROLYSE | |
|---|---|---|
| | ACIDE | ALCALINE |
| Acide lactique | 50 | 42,1 |
| Acide malique | 800 | 729,2 |
| Acide fumarique | 20,8 | 15,7 |
| Acide succinique | 324 | 229,4 |
| Acide citrique | - | - |
| Acide glycolique | - | - |

TABLEAU n° 14 : Dosage par chromatographie en phase vapeur des acides lactique, malique, fumarique, succinique extraits après hydrolyse acide ou alcaline de feuilles d'Artichaut
(résultats exprimés en mg pour 100 g. de plante).

pour le graphiquer avec précision. Il en est de même pour l'acide glycolique qui existe en faible quantité et dont le pic chevauche un pic voisin correspondant semble-t-il à un produit de dégradation dû aux hydrolyses.

c) Conclusions

La chromatographie en phase vapeur nous parait déjà être une méthode complémentaire intéressante de la chromatographie sur couche mince pour l'analyse qualitative des acides organiques couramment rencontrés chez les végétaux, bien que, comme nous l'avons vu dans les cas des acides hydroxyméthylacrylique et fumarique, une seule méthode d'estèrification soit peut-être insuffisante.

Elle conduit toutefois beaucoup plus facilement à des déterminations quantitatives mais son application est alors assez délicate car il importe, avant chaque dosage, d'estimer la qualité de la réponse du détecteur avec des quantités connues d'esters d'acides témoins. La réponse peut effectivement varier, non seulement selon les conditions opératoires, mais également avec la nature de l'ester d'acide organique concerné. Il est nécessaire enfin d'opérer sur des extraits aussi purs que possible afin d'éviter le maximum d'interférences, causes d'erreurs encore plus génantes en quantitatif qu'en qualitatif.

Au vu des résultats obtenus,l'hydrolyse acide de la plante s'avère d'ores et déjà plus favorable que l'hydrolyse alcaline, c'est donc à cette première technique que nous ferons confiance par la suite.

Toutes choses égales par ailleurs, nous avons choisi de nous adresser directement à la chromatographie en phase vapeur qui permet,

dans un milieu relativement impur et malgré une estérification non dénuée d'action traumatisante sur les acides organiques, un repérage, puis un dosage assez rigoureux des acides mis en cause. Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons cependant mis au point une autre technique d'analyse, fondée sur les réactions enzymatiques spécifiques de nos acides organiques.

2) Dosages enzymatiques

Après avoir décrit les techniques générales que nous avons utilisé pour le dosage des acides lactique, malique, citrique et succinique présents dans les extraits d'Artichaut, nous donnerons sous forme d'un tableau les résultats qualitatifs obtenus par l'extrait préparé par hydrolyse acide de l'Artichaut, procédé d'extraction que nous avons retenu.

a) Conditions opératoires

(1) Acide lactique

α. Principe du dosage

La lactique déshydrogénase (L.D.H.) catalyse l'oxydation du L (+) lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (N.A.D.), selon la réaction suivante :

$$\text{L (+) lactate} + \text{N.A.D.}^{+} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^{+}$$

La constante d'équilibre, K = 2,9 $10^{-}$ 12 (moles/L) à 25°C, est en faveur de l'évolution de la réaction de droite à gauche. Il est donc nécessaire pour que celle-ci devienne totale de gauche à droite,

d'éliminer l'un des produits formés au cours de la réaction, ce qui est obtenu par combinaison du pyruvate sous forme de pyruvate-hydrazone.

D'autre part, des quantités relativement élevées de N.A.D.$^+$ et de L.D.H. sont indispensables pour que la réaction globale soit rapide et totale :

$$\text{L (+) lactate} + \text{N.A.D.}^+ + \text{hydrazine} \xrightarrow[\text{pH = 9,5}]{\text{L.D.H.}} \text{pyruvate hydrazone} + \text{NADH}^+ + H_3O^+$$

(d'après HOHORST, 1963)

β. Réactifs

. Tampon hydrazine - glycocolle

(0,4 M hydrazine, I M glycocolle, pH = 9,5)

Après la mise en suspension dans une petite quantité d'eau distillée de 7,5 g de glycocolle, de 5,2 g de sulfate d'hydrazine et de 0,2 g du sel de sodium de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A. - $Na_2H_2$- 2 $H_2O$), on ajoute 51 cm$^3$ de soude 2 N, puis l'on conplète à 100 cm$^3$ avec de l'eau bidistillée. Le pH de la solution est ainsi fixé à pH 9,5.

. βNicotinamide adénine dinucléotide

($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$) commercialisée par les laboratoires BOEHRINGER

Dissoudre 40 mg du coenzyme dans 1 cm$^3$ d'eau bidistillée.

. Lactique déshydrogénase commercialisée par les laboratoires BOEHRINGER.

. Solution étalon de L (+) lactate à 0,002 M.

. Bloc des acides organiques extraits après hydrolyse acide de feuilles sèches d'Artichaut

Le bloc "acide" est extrait selon le protocole opératoire décrit page 72 . Le résidu d'évaporation des liqueurs butanoliques, repris par 50 $cm^3$ d'eau distillée est alors neutralisé à pH 8 par une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 %. Cette dernière solution est finalement lyophilisée. Au moment de l'expérimentation, ce lyophilisat sera dissous dans un volume déterminé d'eau bidistillée.

γ. Lecture spectrophotométrique

Les mesures spectrophotométriques sont faites à la longueur d'onde de 340 nm, dans des cuves de 1 cm d'épaisseur, les deux cuves blanc et essai comprenant :

Cuve d'essai

- 0,90 $cm^3$ du tampon hydrazine-glycocolle pH 9,5
- 0,10 $cm^3$ de la solution de N.A.D.
- 0,20 $cm^3$ d'extrait dont on veut déterminer la teneur en acide lactique ou de solution étalon d'acide lactique de titre connu
- 0,02 $cm^3$ de la suspension de L.D.H.

Cuve servant de blanc

- 0,90 $cm^3$ de tampon hydrazine-glycocolle pH 9,5
- 0,10 $cm^3$ de solution de nicotinamide adénine dinucléotide
- 1 $cm^3$ d'eau bidistillée

La différence entre les densités optiques avant addition de L.D.H. puis de 10 à 20 minutes après addition de l'enzyme, permet de déterminer la teneur en cet acide de l'échantillon analysé, par comparaison à celle obtenue dans les mêmes conditions pour une solution étalon de L (+) lactate.

## (2) Acide malique

### α. Principe du dosage

Par un mécanisme analogue au précédent, la malique-deshydrogénase catalyse l'oxydation du L (-) malate par le nicotinamide adénine dinucléotide. La constante d'équilibre de la réaction $K = 5{,}0\ 10^{-13}$ (moles/l) à 25°C est en faveur de l'évolution de la réaction de droite à gauche. Il est donc nécessaire d'éliminer pour que celle-ci évolue dans le sens favorable, l'oxaloacétate formé sous forme d'oxaloacétate hydrazone. Des quantités élevées de $N.A.D.^+$ et de M.D.H. sont d'autre part requises pour que la réaction suivante soit rapide et totale :

$$\text{L (-) malate} + N.A.D.^+ + \text{hydrazine} \xrightarrow[\text{pH } 9{,}5]{\text{M.D.H.}} \text{oxaloacétate hydrazone} + N.A.D.H. + H_3O^+$$

(d'après HOHORST, 1963)

### β. Réactifs

. Tampon hydrazine - glycocolle pH = 9,5
(préparation voir page 117 )

. βNicotinamide adénine dinucléotide
(commercialisée par les laboratoires BOEHRINGER)

Juste avant l'emploi, on dissout 40 mg du coenzyme dans 1 $cm^3$ d'eau bidistillée.

. Malique déshydrogénase (M.D.H.)

Extrait du coeur de porc, cet enzyme est commercialisé par les laboratoires BOEHRINGER sous forme d'une suspension comprenant 5 mg de malate déshydrogénase par $cm^3$ de solution de sulfate d'ammonium 3,2 M.

. Solution aqueuse étalon de L (-) malate (0,002 M)

. Bloc des acides organiques provenant de l'hydrolyse acide des feuilles sèches d'Artichaut (voir page 118 ).

γ. Lecture spectrophotométrique

Comme précédemment, les mesures spectrophotométriques sont faites à la longueur d'onde de 340 nm, les cuves blanc et essai comprenant respectivement :

<u>cuve d'essai</u>

- 0,90 $cm^3$ du tampon hydrazine-glycine pH 9,5
- 0,10 $cm^3$ de solution de N.A.D.
- 1 $cm^3$ d'une solution étalon d'acide malique ou d'extrait d'Artichaut à une dilution convenable
- 0,01 $cm^3$ de solution de M.D.H.

<u>blanc</u>

- 0,90 $cm^3$ du tampon hydrazine-glycine pH 9,5
- 0,10 $cm^3$ de solution de N.A.D.
- 1 $cm^3$ d'eau bidistillée

Après deux lectures à trois minutes d'intervalle de la densité optique de la cuve expérimentale contenant les 3 premiers réactifs, on ajoute la malate déshydrogénase, ce qui enclenche la tranformation de l'acide malique en acide oxaloacétique. Ainsi, l'augmentation de densité optique due à la transformation N.A.D. ⟶ N.A.D.H., maximale en 10 à 20 minutes selon la teneur du milieu réactionnel en malate, permet d'en déterminer la quantité, par comparaison à celle obtenue dans les mêmes conditions par la solution de L (-) malate étalon.

③ Acide citrique

α. Principe du dosage

Le dosage de l'acide citrique nécessite l'intervention de deux

enzymes : l'aconitase qui transforme le citrate en isocitrate et l'isocitrique-déshydrogénase qui agissant sur ce dernier composé permet d'aboutir à l'oxologlutarate.

Si à l'équilibre, la réaction citrate ⇌ cis aconitate ⇌ isocitrate n'est pas en faveur de la transformation du citrate en isocitrate, il suffit, pour que celle-ci évolue totalement de gauche à droite d'utiliser une solution d'isocitrate déshydrogénase suffisamment active, qui par oxydation et décarboxylation convertit au fur et à mesure de sa formation l'isocitrate en oxaloglutarate.

Ainsi, la réaction globale mise en oeuvre pour le dosage de l'acide citrique peut se résumer de la manière suivante :

$$\text{citrate} + \text{N.A.D.P.} \xrightarrow[\text{I.D.H. } (Mn^{2+})]{\text{aconitase } (Fe^{2+})} \alpha\text{cétoglutarate} + \text{N.A.D.P.H.} + H^{+}$$

(d'après SIEBERT, 1963)

### β. Réactifs

. Tampon tris (0,1 M ; pH 7,4)

Après dissolution de 6,043 g de tris (hydroxyméthyl)-aminométhane et de 0,186 g du sel de sodium de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A. - $Na_2H_2$-2 $H_2O$) dans 100 $cm^3$ d'eau bidistillée, on ajuste à pH 7,4 la solution par de l'acide chlorhydrique 2 N, puis l'on dilue à 500 $cm^3$ avec de l'eau bidistillée.

. L-cystéine (0,05 M ; pH 7,4)

10 minutes avant l'emploi, on dissout 17,6 mg de L-cystéine chlorhydrique, 1 $H_2O$ dans 1 $cm^3$ d'eau bidistillée. La solution ainsi obtenue dont le pH est ajusté à 7,4 par de la soude 1 N est finalement diluée

à 2 $cm^3$ par de l'eau bidistillée.

. Sulfate ferreux ammoniacal ($10^{-3}$ M)

20 $cm^3$ de cette solution renferme 7,84 mg de Fe $(NH_4)_2$ $(SO_4)_2$- 6 $H_2O$.

. Solution aqueuse à 0,02 M de sulfate de manganèse

. Aconitase activée

Activation de l'enzyme

15 mg d'enzyme extraite du coeur de porc (produit commercialisé par les laboratoires SIGMA) sont dissous dans 2 $cm^3$ de tampon tris 0,1 M ; pH 7,4. Après addition de sulfate ferreux d'ammonium 0,001 M et de 0,1 $cm^3$ de L(+)cystéine 0,05 M, on laisse le mélange réactionnel une heure à la température de 0°C.

. βNicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate forme oxydée (laboratoires BOEHRINGER)

12,4 mg du coenzyme sont dissous dans 3 $cm^3$ de tampon tris (0,1 M ; pH 7,4).

. Isocitrique-déshydrogénase I.D.H. (laboratoires BOEHRINGER)

Dissoudre juste avant l'emploi 10 mg de l'enzyme dans 3 $cm^3$ d'eau bidistillée.

. Tartrate double de potassium et de sodium (0,3 M ; pH 7,2)

8,467 g de $KNaC_4H_4O_6$- 4 $H_2O$ sont dissous dans 50 $cm^3$ d'eau bidistillée. Après en avoir fixé le pH à 7,4, la solution est diluée à 100 $cm^3$ avec de l'eau bidistillée.

. Solution aqueuse standard de citrate de sodium ($2.10^{-3}$ M).

. Bloc des acides organiques extraits après hydrolyse acide des feuilles sèches d'Artichaut (voir page 118 ).

γ. Lecture spectrophotométrique

Les mesures sont faites à la longueur d'onde de 340 nm, contre l'air ou l'eau, la cuve expérimentale de 1 cm d'épaisseur comprenant :

- 0,8 $cm^3$ de tampon tris
- 0,1 $cm^3$ de solution de sulfate de manganèse
- 0,05 $cm^3$ de solution d'I.D.H.
- 0,1 $cm^3$ de solution de tartrate
- 0,1 $cm^3$ de solution d'aconitase
- 1,2 $cm^3$ d'eau bidistillée
- 0,05 $cm^3$ de la solution étalon de citrate ou d'une dilution convenable de l'échantillon d'Artichaut
- 0,03 $cm^3$ de la solution de nicotinamide adénine dinucléotide

Il est ainsi possible par différence entre la densité optique lue avant addition dans la cuve du βnicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate, et celle obtenue à la fin de réaction engendrée par l'addition de ce coenzyme, de déterminer la teneur en citrate de l'échantillon analysé.

④ Acide succinique

α. Principe du dosage

En présence de succinyl-déshydrogénase (S.D.), le succinate donne naissance au fumarate selon la réaction suivante :

$$\text{succinate} \rightleftharpoons \text{fumarate} + 2\ H^+ + 2e$$

Le terme de la réaction sera apprécié en ajoutant au milieu réactionnel un accepteur d'électrons coloré, qui, de ce fait, sera réduit en son dérivé incolore. A cet effet, le ferricyanure de sodium qui ne présente aucun effet néfaste pour la succinyl-déshydrogénase semble le composé le mieux adapté pour remplir cette fonction.

Il est cependant nécessaire d'opérer en présence d'un excès de succinyl-déshydrogénase pour que la réaction globale évolue rapidement et totalement de gauche à droite :

$$\text{Succinate} + 2\ (Fe\ (CN)_6)^{3-} \longrightarrow \text{fumarate} + 2\ H^+ + 2\ (Fe\ (CN)_6)^{4-}$$

(d'après SINGER, BERNATH et LUSTY, 1963).

Remarque :

Si la technique dont nous venons de décrire le principe est celle que nous avons appliquée à nos extraits d'Artichaut, il faut signaler que d'autres méthodes impliquant également l'intervention d'enzymes ont été décrites en vue du dosage de l'acide succinique. A titre d'exemple, mentionnons la méthode faisant intervenir la succinyl-thiokinase (S.T.K.), la pyruvate-kinase (P.K.), et la lactate-déshydrogénase (L.D.H.) et dont les différents stades réactionnels peuvent être résumés de la façon suivante :

$$\text{Succinate} + \text{A.T.P.} + \text{C oA} \underset{(\text{S.T.K.})}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{succinyl C oA} + P_i + \text{A.D.P.}$$

$$\text{A.D.P.} + \text{phosphoénolpyruvate} \underset{(\text{P.K.})}{\overset{Mg^{2+}}{\longrightarrow}} \text{pyruvate} + \text{A.T.P.}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{N.A.D.H.} + H^+ \underset{(\text{L.D.H.})}{\longrightarrow} \text{L(-)lactate} + \text{NA.D.}^+$$

(d'après WILLIAMSON et CORKEY, 1969).

β. Réactifs

. Solution aqueuse de ferricyanure de sodium (0,1 M)

. Tampon tris (0,3 M ; pH 7,6)

Solution aqueuse à 3,6 % (P/V) de tris hydroxyméthylaminométhane dont le pH a été fixé à 7,6 par de l'acide chlorhydrique 1 N.

. Solution aqueuse étalon de succinate de sodium (0,01 M ; pH 7,6)

. Solution aqueuse de malonate (1 M, pH 7,6)

. Succinate déshydrogénase (S.D.)

L'enzyme non commercialisé a été extrait par nos soins à partir de mitochondries de coeur de boeuf, selon le procédé décrit par BERNATH et SINGER (1962). Schématiquement, les différentes étapes de sa préparation sont les suivantes :

- préparation d'un extrait mitochondrial de coeur de boeuf
- élimination des contaminants par un tampon neutre phosphaté
- extraction de la succinate déshydrogénase par un tampon glycine (pH 10,3)
- neutralisation de ce dernier extrait sur une colonne de résine échange d'ions DOWEX 50
- adsorption de l'enzyme sur un gel calcique et phosphaté suivie de son élution à l'aide d'un tampon phosphaté.

La préparation est finalement diluée avec le tampon tris (0,03 M) dans les proportions 1-10 (V/V).

. Bloc des acides organiques extrait après hydrolyse acide de feuilles sèches d'Artichaut (voir page 118 ).

γ. Lecture spectrophotométrique

Effectuées à la longueur d'onde de 450 nm, ces mesures nécessitent une cuve expérimentale, une cuve blanc et une cuve de contrôle contenant respectivement :

| | CUVE EXPERIMENTALE | CUVE BLANC | CUVE CONTROLE |
|---|---|---|---|
| olution de tampon tris | 0,50 $cm^3$ | 0,50 $cm^3$ | 0,50 $cm^3$ |
| olution de ferricyanure de odium | 0,10 $cm^3$ | | 0,10 $cm^3$ |
| olution étalon de succinate u dilution aqueuse de 'extrait d'Artichaut | volume contenant 0,4 à 4 µmoles de succinate | | volume contenant 0,4 à 4 µmoles de succinate |
| au bidistillée | quantité suffisante pour volume de 2,90 cm3 | quantité suffisante pour volume de 2,90 $cm^3$ | quantité suffisante pour volume de 2,85 $cm^3$ |
| olution de malonate | | | 0,05 $cm^3$ |

Après lecture des densités optiques des cuves expérimentale et contrôle, on ajoute dans ces dernières, ainsi que dans la cuve servant de blanc, 0,1 $cm^3$ de la solution de succinate-déshydrogénase.

Dans ces conditions, la densité optique de la cuve expérimentale diminue, pour se fixer à sa valeur minimale en 15 minutes, tandis que la densité optique initiale de la cuve contrôle contenant le malonate, inhibiteur de la succinyl-déshydrogénase, doit rester inchangée. Ainsi, la différence entre la densité optique initiale et finale de la cuve expérimentale, proportionnelle à la quantité de succinate transformé en fumarate , nous permettra de déterminer la teneur en succinate de l'échantillon analysé, par comparaison à celle obtenue dans les mêmes conditions par une solution étalon de succinate.

b) Résultats

Le dosage enzymatique des acides lactique, citrique, malique et succinique effectué sur le bloc acide extrait après hydrolyse acide de feuilles sèches d'Artichaut conduit aux résultats consignés dans le tableau n° 15 . Les teneurs en ces acides sont exprimées en mg pour 100 g de feuilles sèches. Nous n'avons pas dosé par cette méthode les acides fumarique, glycolique et glycérique, présents en très faibles quantités dans notre échantillon faute des enzymes nécessaires dont deux ne sont pas commercialisés.

3) Conclusions

En comparant ces résultats à ceux obtenus lors des dosages par chromatographie en phase vapeur des extraits obtenus après hydrolyse acide (tableau n° 14 , colonne de gauche), pour les acides malique et lactique, nous remarquons une assez bonne corrélation entre les chiffres. Mais nous pouvons voir cependant que si le dosage de l'acide malique est concordant dans les deux cas, le dosage de l'acide lactique donne des résultats plus élevés en chromatographie en phase vapeur. Le dosage de l'acide citrique n'est réalisable que par voie enzymatique ; cela tient au fait qu'en chromatographie en phase vapeur, dans les conditions opératoires nécessaires pour avoir une séparation convenable de l'acide succinique et de l'acide hydroxyméthylacrylique, l'ester méthylique de l'acide citrique sort trop tard et que la réponse du détecteur est probablement insuffisante. On voit par cet exemple, que pour réaliser, avec une grande sécurité, le dosage de ces acides organiques en milieu végétal, il faut confronter plusieurs techniques, précaution souvent nécessaire d'ailleurs pour l'analyse des milieux biologiques.

| ACIDES | TAUX EXPRIMES EN mg/100 g DE FEUILLES SECHES |
|---|---|
| Acide lactique | 40,2 mg |
| Acide fumarique | |
| Acide succinique | 0 |
| Acide malique | 812,02 mg |
| Acide glycolique | |
| Acide glycérique | |
| Acide citrique | 5,20 mg |

Tableau n° 15 : Dosage enzymatique des acides lactique, malique et citrique effectué après hydrolyse acide de feuilles sèches d'Artichaut.

Contrairement à ce que l'on pouvait penser, les dosages enzymatiques ne sont pas dénués de toute critique, bien qu'ils devaient avoir a priori toute notre confiance par leur spécificité et leur précision. Il semble bien qu'il existe dans le matériel végétal des composés parasites inhibiteurs de certains enzymes : l'exemple nous en a déjà été fourni par le Piloselle (BOGAERT, MORTIER, DELAVEAU, JOUANY et PELT, 1972) qui contient de l'acide tartrique, inhibiteur de l'aconitase (SIEBERG, 1963). Dans ce cas précis, la méthode est donc inapplicable au dosage de l'acide citrique, car l'aconitase ainsi inhibée ne permet plus le passage de l'acide citrique à l'acide cis aconitique. Il paraît en être de même pour l'acide succinique. En effet, les tentatives de dosage de cet acide effectué sur l'Artichaut, se sont toujours révélées infructueuses, bien que la présence de ce corps organique ait été confirmée par les différentes techniques chromatographiques.

Il s'est avéré, comme nous le verrons dans le chapitre suivant que le dérivé acrylique présent dans les extraits d'Artichaut est un inhibiteur de la succinyl-déshydrogénase, rendant ainsi le dosage de l'acide succinique impossible.

Par ailleurs, l'acide malique représente le composé le plus important du bloc acide : il apparaît donc comme l'un des élément du cycle de KREBS le mieux accumulé.

Les variations corrélatives des acides citrique et lactique semblent d'autre part intéressantes. En effet, ce dernier acide, terme ultime de la glycolyse anaérobie (voie d'Embden et Meyerhof), ne peut s'accumuler que si l'acide pyruvique auquel il donne naissance par déshydrogénation n'est pas transformé en acide citrique, initiateur du cycle de KREBS. Le rapport lactique sur citrique semble donc indiquer

lorsqu'il augmente la dominance de la glycolyse anaérobie ; à l'inverse lorsqu'il diminue, il signifierait une facilitation du cycle aérobie.

Ainsi, le dosage des acides organiques contenus dans les "bloc acide" de différentes plantes pourraient être considérés comme témoins indirects des orientations métaboliques privilégiées de ces plantes ; c'est ce que nous avons essayé d'étudier avec MORTIER, DE-LAVEAU, JOUANY, PELT (1972).

C - Hypothèse sur l'origine et l'accumulation des acides organiques

1) L'origine de l'acide hydroxyméthylacrylique

Avant de rechercher quelques explications à l'accumulation des acides du cycle de Krebs dans les feuilles d'Artichaut, il nous a semblé indispensable d'envisager les voies métaboliques possibles conduisant au radical acrylique. En effet, comme nous l'avons vu, l'Artichaut renferme un acide particulier, l'acide hydroxyméthylacrylique, qui, outre sa présence à l'état libre, constitue la chaîne latérale de la cynaropicrine.

Comme le montre la figure n° XIX , les trois origines métaboliques possibles de l'acide acrylique ou de l'un de ses dérivés sont les suivantes :

- décarboxylation grâce à la fumarase de l'acide fumarique qui ainsi donne naissance à l'acide acrylique ( CHON - TON PHAN, 1971).

- désamination de la β-alanine pour donner naissance à l'acide acrylique qui à son tour donne naissance par décarboxylation à l'éthylène ( CHON - TON PHAN, 1971).

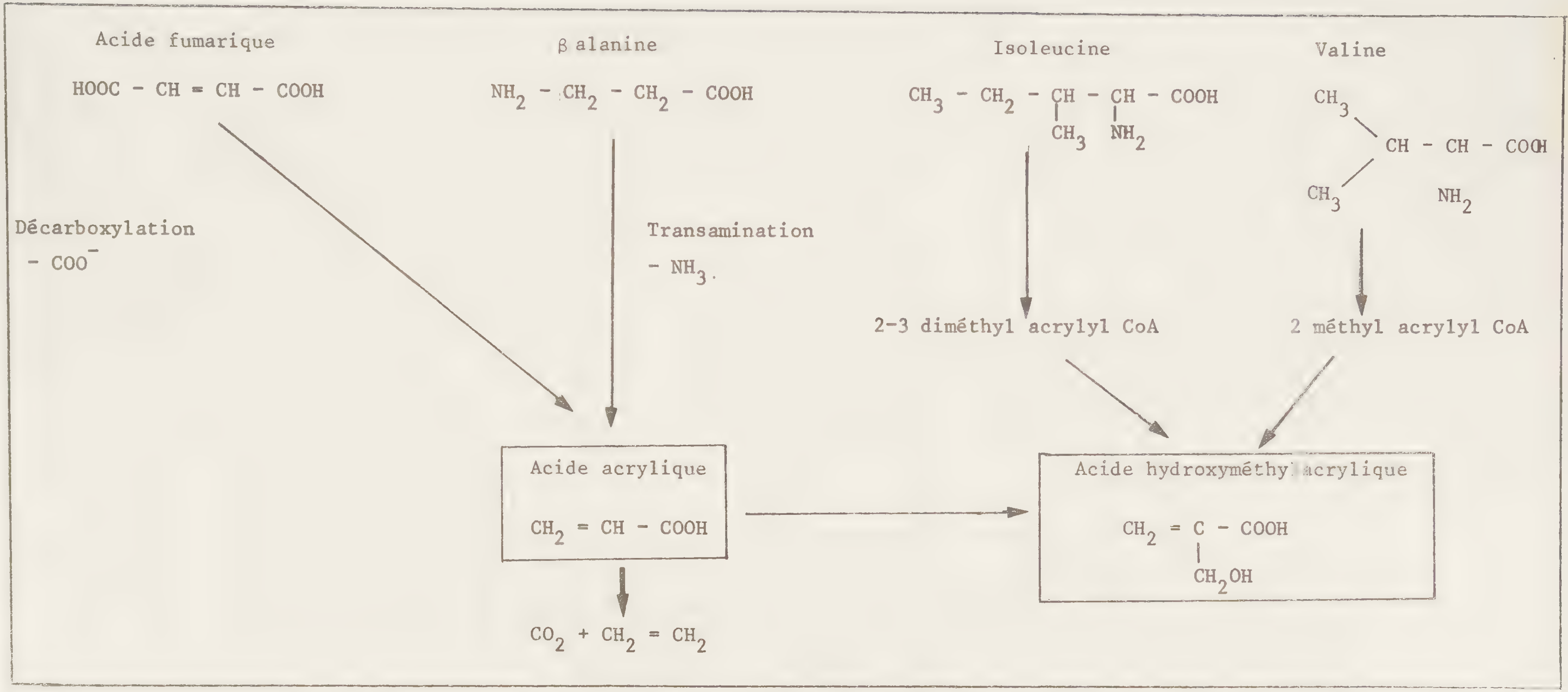



Figure n° XIX : Hypothèses sur l'origine métabolique de l'acide hydroxyméthylacrylique.

- catabolisme de l'isoleucine et de la valine dont les intermédiaires formés au cours de leur dégradation sont respectivement : le 2-3 diméthylacrylyl coA, et le 2 méthylacrylyl coA (DAVES, 1964).

On peut alors envisager à partir du radical acrylique des transformations telles que méthylation et hydratation qui conduiraient ainsi à l'acide hydroxyméthylacrylique. Ce dernier viendrait saturer le reste guaïanolide pour former ainsi la cynaropicrine, tandis que l'excès d'acide hydroxyméthylacrylique resterait à l'état libre.

2) Les processus d'accumulation des autres acides

Il ressort de l'étude quantitative précédente que, parmi les acides intermédiaires du cycle de Krebs, l'Artichaut accumule de façon privilégiée les acides malique et succinique. L'acide citrique est en quantité nettement moins importante. Ce phénomène ne semble d'ailleurs pas spécifique à cette plante. Nous l'avons nous-mêmes constatés en dosant les acides malique, citrique et lactique dans huit espèces végétales réputées à propriétés hépatorénales (BOGAERT, MORTIER, DELAVEAU, JOUANY, PELT, 1972) : l'acide malique était toujours fortement dominant (plus de 60 % des acides totaux) dans les organes utilisés en thérapeutique. La teneur en acide citrique ne dépassait pas 2,5 %. L'abondante présence de cet acide dans certains fruits, type *Citrus*, ne relève sans doute pas des mêmes processus car il s'agit alors d'une accumulation dans les organes de réserve (fruits) et non dans les organes effectuant la photosynthèse (feuilles), accumulation favorisée par l'absence d'enzymes spécifiques.

Différents travaux effectués sur les tissus de feuilles appartenant à la famille des Crassulacées et des Cactacées, montrent également une accumulation de quelques acides organiques, avec des disparités considérables dans leurs proportions respectives ; les travaux de MOYSE et

JOLCHINE (1958), nous en donnent une belle illustration : il y a cent fois plus d'acide malique que d'acide fumarique dans les feuilles de *Bryophyllum*.

L'accumulation de certains acides organiques constitue donc un caractère particulier du métabolisme des végétaux. En effet, les tissus animaux sont non seulement pauvres en acides organiques, mais les quantités des différents acides y sont toujours du même ordre de grandeur, ce qui s'accorde semble-t-il avec un déroulement harmonieux du cycle de Krebs.

Par quels processus biosynthétiques s'effectuent ces accumulations dans les végétaux ?

L'accumulation d'acide succinique, nous allons le voir, peut être rapportée à un dysfonctionnement du cycle de Krebs. En effet, l'acide hydroxyméthylacrylique est un inhibiteur de la succinyl-déshydrogénase : on conçoit alors aisèment que dans ce cas, l'acide succinique s'accumule puisque son enzyme de dégradation est bloquée.

Cependant si d'autres mécanismes, comme un catabolisme accru de certains amino-acides (figure n° XX ) peuvent provoquer des accumulations d'acides organiques dans la cellule. Il faut d'autre part noter que les conditions climatiques et d'éclairement semblent prendre une part importante dans ces phénomènes d'accumulation. C'est ainsi que MOYSE et JOLCHINE (1956) ont montré le rôle très important joué par l'oxygène et la lumière dans l'accumulation de l'acide malique par les feuilles des Crassulacées. Cette accumulation dépend également de la tension de gaz carbonique. Elle est toujours plus importante en présence d'une forte tension partielle de $CO_2$ que lorsque les tissus ne disposent que du $CO_2$ d'origine respiratoire. Les mêmes constatations s'appliquent aux augmentations des acides isocitrique et citrique également constatées chez le *Bryophyllum daigremontianum* ( MOYSE et JOLCHINE, 1956).

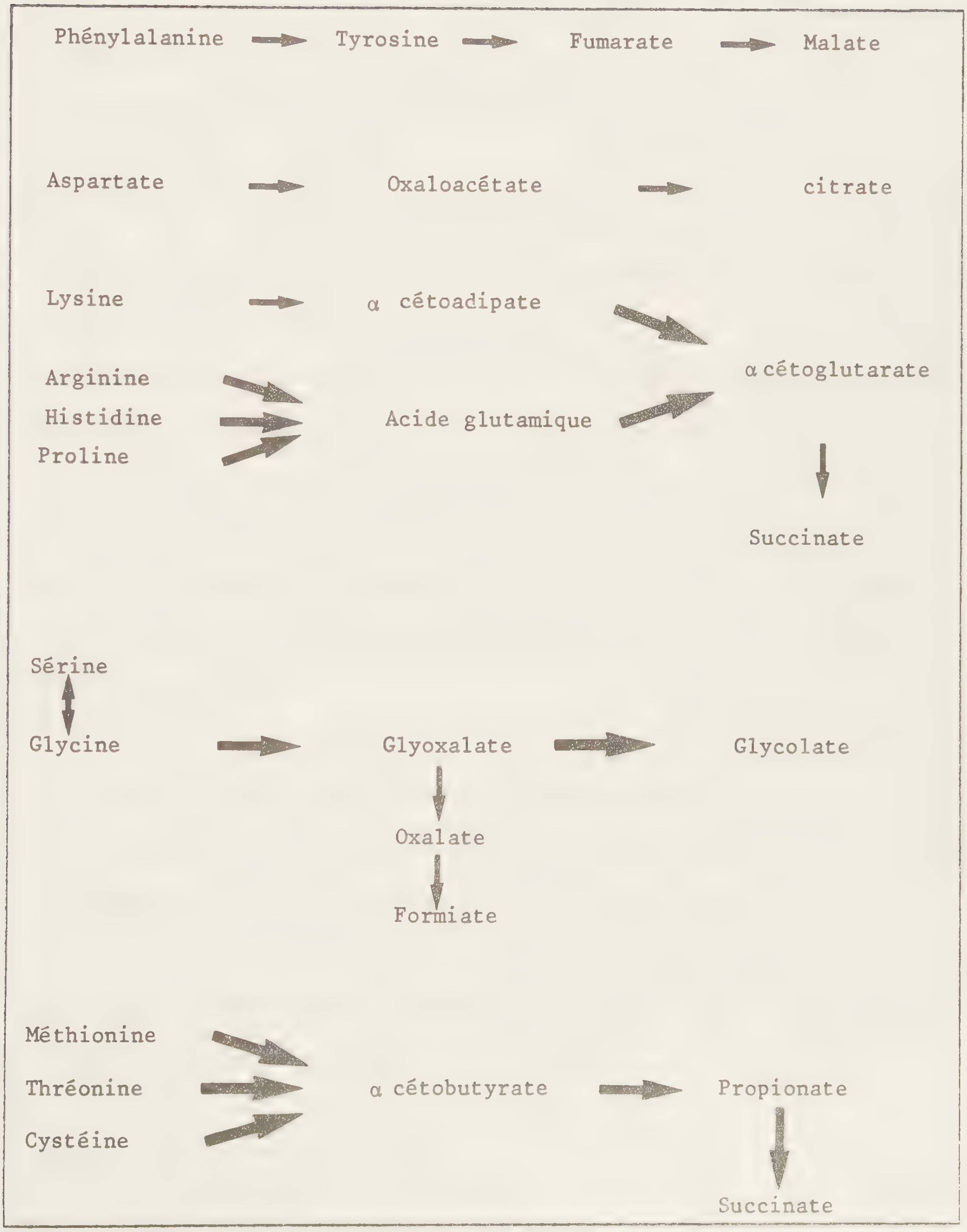



Figure n° XX : Métabolisme de quelques amino-acides conduisant à la formation d'acides organiques et permettant ainsi d'expliquer par leur catabolisme accru l'accumulation de certains acides dans une espèce végétale.

Cependant, une question majeure se pose : pourquoi les cellules d'une espèces accumulent-elles de façon privilégiée un acide tandis que les cellules d'une autre espèce accumulent un autre acide et pourquoi ces accumulations ne se produisent-elles que dans le règne végétal ?

Si on peut répondre à la première question que la production et la consommation d'un acide varie d'une espèce à l'autre, en fonction de son métabolisme spécifique, il faut d'autre part se souvenir de la présence dans la cellule végétale d'une vacuole, qui n'existe pas dans la cellule animale.

Or, comme l'ont montré Mac LECNNAN, BEEVERS, HARLEY (1963) plusieurs "compartiments" d'acides existeraient dans la cellule, dont le plus important serait la vacuole. Celle-ci jouerait alors le rôle de stockage des acides organiques produits au niveau du cycle de Krebs et transportés jusqu'à celle-ci par un mécanisme de "transport actif". Ce mécanisme de transport serait à son tour plus ou moins spécifique de chaque acide selon les espèces, ce qui pourrait expliquer alors l'accumulation prépondérante d'un acide. En tout cas, le rôle de la vacuole est sans doute déterminant puisqu'il ne se produit pas d'accumulation dans le règne animal.

Quoi qu'il en soit, on peut dire que le stockage préférentiel de certains acides procède pour la plupart du temps de la mise en oeuvre de biosynthèses parallèles à la voie classique faisant partie des processus propres à une espèce donnée ou encore d'un processus de défense.

Equilibre dynamique et accumulation préférentielle sont donc les deux modes expliquant la présence qualitative et quantitative des divers acides organiques dans le règne végétal.

# TROISIEME PARTIE

# ACTIVITES BIOLOGIQUES

# DU BLOC ACIDE ET EN PARTICULIER

# DE L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE

## CHAPITRE I : ACTIVITE BIOLOGIQUE : RECHERCHE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE DE LA SUCCINYL-DESHYDROGENASE

Comme nous l'avons déjà signalé précédemment, le dosage de l'acide succinique s'est avéré impossible par voie enzymatique, bien que la présence de cet acide dans nos extraits ait été confirmée par deux techniques différentes : la chromatographie en couche mince et la chromatographie en phase vapeur.

Le but de ce travail a donc été de rechercher s'il n'existait pas dans nos extraits un acide organique ou tout autre composé susceptible d'inhiber la succinyl-déshydrogénase, enzyme nécessaire au dosage, par notre méthode , de l'acide succinique.

Dans ce but, reprenant la technique décrite page123, nous avons vérifié dans un premier temps, l'activité de notre succinyl-déshydrogénase vis-à-vis d'une solution étalon d'acide succinique. Ayant ainsi pu constater que le dosage de l'acide succinique par la méthode enzymatique utilisant la succinyl-déshydrogénase était reproductible, nous avons tenté de refaire la même opération en présence de l'un des différents acides organiques suivants présents dans l'extrait d'Artichaut : acides malique, citrique, lactique (commercialisés par les laboratoires MERCK) et hydroxyméthylacrylique préparé par synthèse.

Ainsi, seule la cuve expérimentale contenant l'acide succinique (2 µmoles) et l'acide hydroxyméthylacrylique (8 µmoles) a une densité optique invariable, malgré l'addition de la succinyl-déshydrogénase. Ceci indique donc, un blocage de l'enzyme par l'acide hydroxyméthylacrylique, puisque nous nous trouvions dans les conditions optimales d'activité de la succinyl-déshydrogénase.

Ce blocage de la succinyl-déshydrogénase, l'une des enzymes fondamentales du cycle de Krebs (figure n° XXI ), doit entraîner une accumulation d'acide succinique, phénomène qui, comme nous le verrons ci-dessous, peut contribuer à expliquer certaines propriétés pharmacologiques des extraits d'Artichaut.

Quant à la nature du phénomène d'inhibition constaté, il est difficile de connaître le mécanisme mis en jeu : s'agit-il d'une inhibition compétitive ou d'une inhibition allostérique, seule l'expérience pourra le dire. Toutefois, la succinyl-déshydrogénase n'étant pas commercialisée, cette expérimentation aurait exigé de longues opérations d'extraction et de purification que nous nous sommes contentés d'effectuer une seule fois pour le dosage de l'acide succinique, ce qui d'ailleurs nous a permis de mettre en évidence ce phénomène d'inhibition. Nous nous proposons d'ailleurs par la suite d'éclaircir ce point.

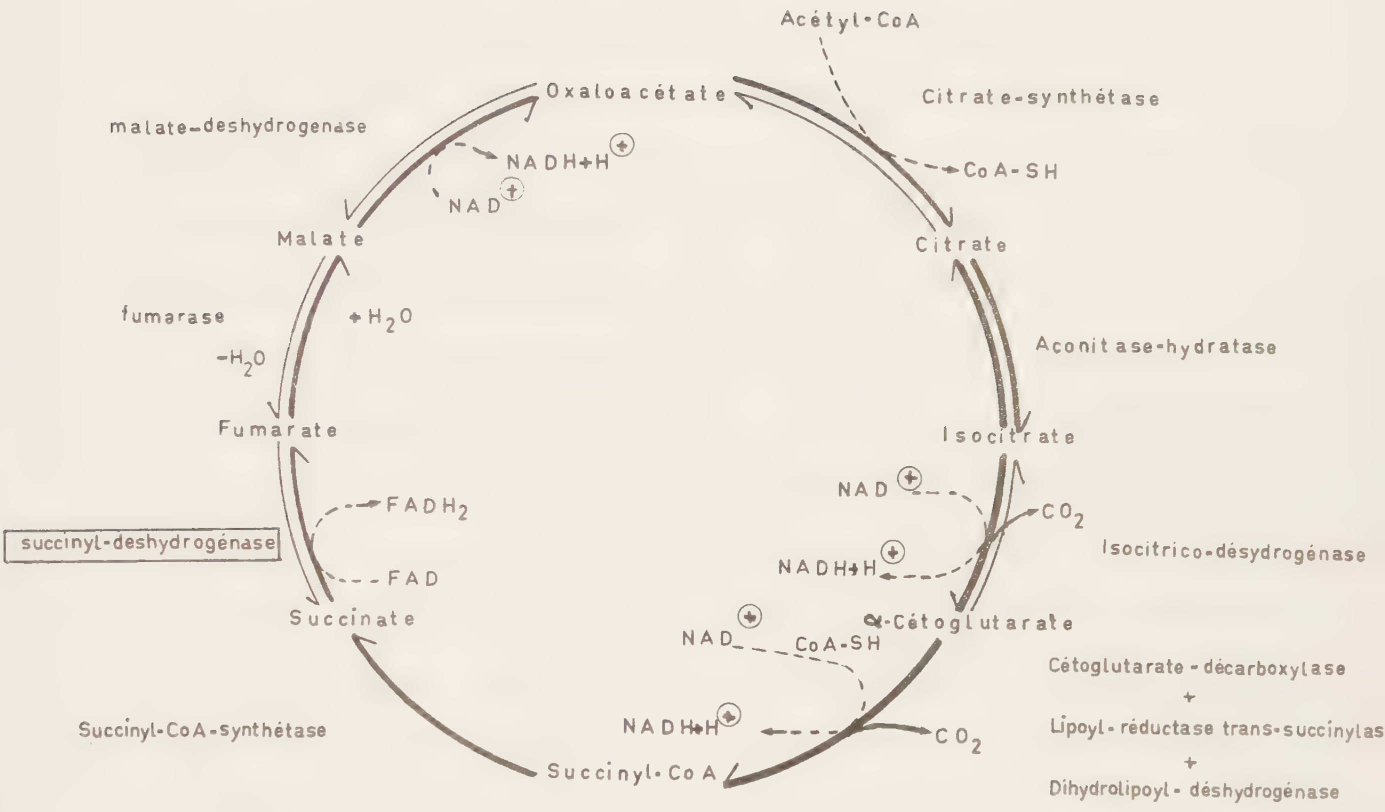



Figure XXI : Inhibition d'un des enzymes du cycle de Krebs.

## CHAPITRE II : ACTION SUR LES ETRES VIVANTS

Sans prétendre refaire ici un historique détaillé sur la connaissance des vertus thérapeutiques de l'Artichaut, il est bon de rappeler que les études thérapeutiques modernes de l'action de cette plante sont nées des travaux de BREL (1930), qui constata son efficacité dans les ictères. L'action cholérètique fut ensuite étudiée par CHABROL et ses collaborateurs (1931), puis par LOEPER et LEMAIRE (1932), enfin par MONVILLE (1933). Les nombreux travaux publiés à partir de cette date visèrent à pousser plus avant l'étude des propriétés thérapeutiques de la plante. C'est ainsi que les préparations à base de feuilles d'Artichaut, outre leur action cholérètique, augmenteraient les fonctions uréogéniques et détoxicantes du foie (TIXIER, de SEZE, ECK, 1934), favoriseraient la diurèse et l'élimination de l'urée urinaire (PICARD, 1935), abaisseraient le taux d'urée sanguine et enfin diminueraient la cholestérolémie (PICARD, 1935), GARROS, 1934), (TIXIER, de SEZE, ECK, 1934).

Si les propriétés pharmacologiques essentielles des extraits totaux de feuilles d'Artichaut étaient donc déjà établies en 1935, il fallut attendre pour connaître au moins l'un des principes responsables des activités précitées les travaux de PANIZZI et SCARPATI (1954) qui isolèrent sous le nom de cynarine l'acide dicaféyl-1, 4 quinique.

En effet, à la suite de nombreux travaux, dont les plus importants sont dus aux auteurs italiens PRESZIOSI et LOSCALZO, cette molécule put être considérée comme responsable d'un certain nombre de propriétés pharmacologiques.

Il nous a semblé utile de les récapituler ici, ce qui permettra ensuite de mettre plus clairement en évidence les effets physiologiques propres aux acides alcools précédemment décrits.

A - Caractéristiques pharmacologiques de l'acide dicaféyl-1,4 quinique

1) Action vis-à-vis du foie

a) Effets cholérétiques

Pour démontrer l'action cholérètique de la cynarine, PREZIOSI et LOSCALZO (1957) ont choisi le rat en fistule biliaire temporaire. Les animaux ont reçu des doses croissantes de cynarine dissoute dans différents solvants et en particulier dans le tampon $Na_2H\ PO_4$ M/5 qui favorise la solubilisation du produit.

Dans ces conditions, l'effet cholérètique d'une dose modeste de cynarine (7-15 mg/kg), comparé à celui provoqué par des doses équimoléculaires de déhydrocholate de sodium (5,53-11,85 mg/kg), est net. Des résultats comparables sont enregistrés après injection de doses avoisinant 30 mg/kg. Pour des doses nettement supérieures (100 mg/kg), l'activité cholérètique de la cynarine durant la première heure est légèrement inférieure à celle induite par une dose équimoléculaire de déhydrocholate de sodium (79 mg/kg). Cependant, dans ce cas, son action se prolonge pendant quatre heures, alors que l'action cholérètique du déhydrocholate de sodium ne dure qu'environ deux heures (fig.XXII et XXIII).

Ces mêmes expériences ont permis en outre de montrer que la cynarine pouvait être considérée comme un cholérètique "vrai". En effet, si ce produit comme le déhydrocholate de sodium, exalte l'émission de bile, il est le seul à favoriser l'excrétion biliaire du cholestérol

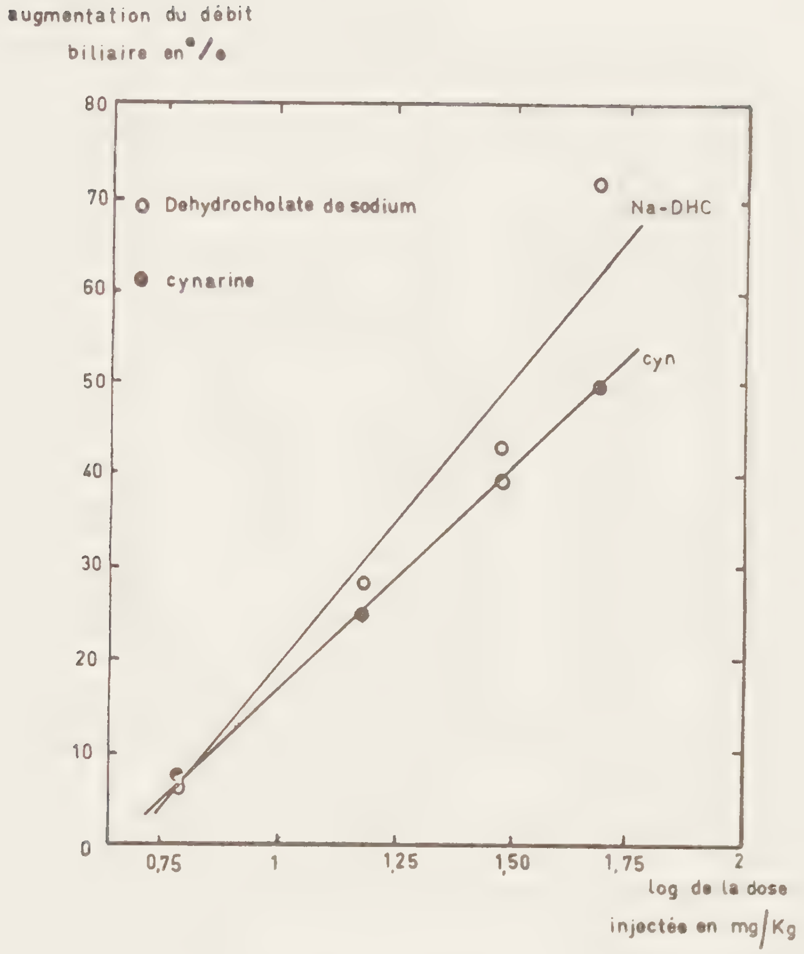



Figure n° XXII : Relation entre la dose injectée de cynarine ou de déhydrocholate de sodium et la variation du flux biliaire observé au bout de l'heure qui suit l'injection.

Flux biliaire

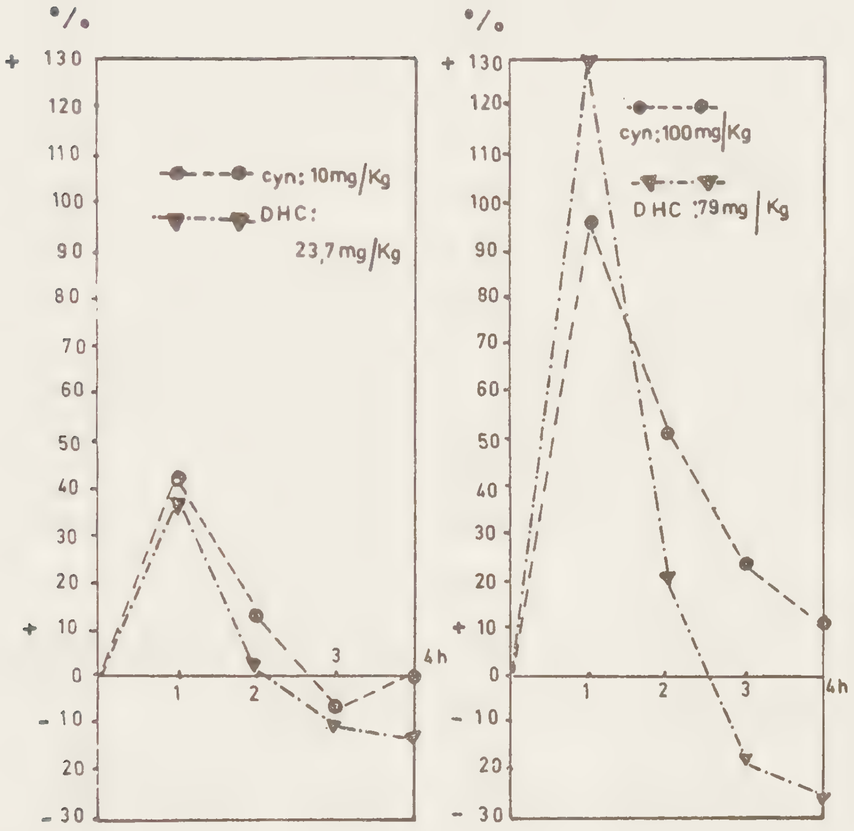



Figure n°XXIII : Comparaison de l'activité cholérètique de la cynarine et du déhydrocholate de sodium injectés à doses équimoléculaires à des rats en fistule biliaire temporaire (d'après PRESZIOSI et LOSCALZO).

dont la concentration dans la bile augmente tandis que les pigments et les sels biliaires ne semblent subir que peu de variations.

Il faut également signaler l'action favorable de la cynarine vis-à-vis de substances étrangères telles que la bromosulfone-phtaléine injectée à l'animal à la dose de 5 mg/kg, dont elle accélère l'élimination.

b) Potentialisation de la fonction antitoxique du foie

L'action protectrice de la cynarine vis-à-vis de certains toxiques peut-être évaluée en comparant le temps d'excrétion biliaire de la bromosulfonephtaléine chez des animaux répartis en plusieurs lots, dont l'un sert de témoin tandis que les autres reçoivent respectivement une dose unique et non élevée d'un toxique tel que le tétrachlorure de carbone, ou la même dose de toxique et la cynaropicrine injectée par voie intramusculaire à la dose de 100 mg/kg.

Comme le montrent les résultats consignés dans le tableau n° 16 l'acide caféyl-1,4 quinique protège le foie vis-à-vis du tétrachlorure de carbone, constatation qui semble d'ailleurs renforcée par la moindre élévation de l'activité transaminasique plasmatique, indice de l'activité nécrosante du tétrachlorure de carbone.

Il faut toutefois signaler que cette propriété ne peut s'étendre aux autres solvants chlorés. En effet, aucun effet protecteur de la cynaropicrine n'a été décelé vis-à-vis du dichloro-éthane, solvant qui provoque, on le sait, une dégénérescence graisseuse du foie.

2) <u>Action sur le métabolisme du cholestérol</u>

Vue l'importance du cholestérol en pathologie, l'étude des

| Produits administrés | Délai d'élimination biliaire de la B.S.P* en minute ± e.s.* | % de la B.S.P*. éliminée par la bile au bout de | | Volume de bile excrétée au bout de | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 30 minutes | 60 minutes | 30 Minutes | 60 minutes |
| | 3'35" ± 0'7" | 37,38 ± 2,26 | 43,72 ± 2,34 | 0,350 | 0,780 |
| $Ccl_4$ | 5'42" ± 0'10" | 12,17 ± 2,13 | 17,43 ± 1,58 | 0,275 | 0,517 |
| $Ccl_4$ + cynarine par voie intramusculaire (100 mg/kg) | 3'53" ± 0'13" | 18,71 ± 1,21 | 30,27 ± 2,74 | 0,680 | 1,330 |

* B.S.P. = Bromosulfonephtaléine

* e.s. = écart standard

Tableau n° 16 : Action de la cynarine vis-à-vis de l' inhibition de l'excrétion biliaire de la bromosulfonephtaléine (test à la B.S.P.) provoquée par l'administration à des rats de tétrachlorure de carbone.

propriétés hypocholestérolémiantes du *Cynara scolymus* et de la cynarine a fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels on peut citer ceux de ECK et DESBORDES (1935), LEGRAND (1948), SAMOCHOWIEC (1959).

On peut en rappeler les principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'action de la cynarine vis-à-vis d'animaux soit normaux soit en hypercholestérolémie.

a) Action sur l'animal dont la cholestérolémie est normale

L'injection à des lapins par voie intraveineuse de 200 mg/kg de cynarine provoque une diminution du cholestérol total plasmatique dans les 8 heures qui suivent l'injection du produit. Cette diminution, peu significative statistiquement, est rapidement réversible.

b) Action sur l'animal en hypercholestérolémie

Comme le montrent les expériences effectuées sur le Triton soumis à des régimes hyperlipidémiques (PRESIOZI et LOSCALZO, 1957 et 1959), la cynarine administrée par voie orale ou par voie intrapéritonéale à la dose de 200 mg/kg possède des pouvoirs hypocholestérolémiant et hypolipidémique non négligeables (tableau n°17 ). Une expérimentation similaire effectuée sur le lapin conduit à des résultats analogues. Récemment, PORIGO et FASSINA (1970) ont précisé le mode d'action de la cynarine en montrant que par sa structure polyphénolique cette molécule interférait, par un mécanisme d'inhibition, avec les hormones induisant la lipolyse.

| Lots de tritons en expérience | Cholestérol total plasmatique en mg/100 cm3 de sang | % d'inhibition de l'hypercholestérolémie | Lipides totaux en mg/100 $cm^3$ de sang | % d'inhibition de l'hyperlipidémie |
|---|---|---|---|---|
| Lot témoin | 99,21 ± 8 | | 429,66 ± 31,68 | |
| Lot hypercholestérolémique (régime) | 204,10 ± 8,52 | | 1205,86 ± 76,50 | |
| Lot hypercholestérolémique + injection intrapéritonéale de cynarine (200 mg/kg) | 177,72 ± 3,4 | 12,93 | 715,14 ± 76,16 | 40,70 |
| Lot hypercholestérolémique + injection intrapéritonéale de cynarine (500 mg/kg) | 185,00 ± 12,29 | 9,36 | 822,00 ± 51,29 | 31,84 |
| Lot hypercholestérolémique + administration par voie orale de cynarine (200 mg/kg) | 185,00 ± 12,07 | 9,36 | 789,69 ± 13,1 | 34,53 |

Tableau n° 17 : Action de la cynarine sur l'hypercholestérolémie et sur l'hyperlipidémie expérimentale du Triton (d'après PRESZIOSI et LOSCALZO, 1957)

3) Action diurétique et action sur le pouvoir de concentration du rein

Si l'Artichaut augmente dans des proportions importantes la diurèse et le pouvoir concentrateur du rein, la cynarine n'en semble que très légèrement responsable. En effet, les différentes expériences décrites dans la littérature n'ont permis de déceler pour cette molécule qu'une activité diurétique très inconstante. Toutefois, comme le suggèrent PARIS et MOYSE (1971), les autres composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les acides caféïque et chlorogénique présents dans les feuilles d'Artichaut pourraient renforcer l'action diurétique de la cynarine.

Il en serait de même pour les actions hypoazotémique et préventive de la néphroso-néphrite ou seul le totum des composés polyphénoliques est actif (SOKOLOVA, LYOUBARTSEVA, VASILTCHENKO, 1970).

4) Action antibactérienne - antivirale

Comme l'acide caféïque et son ester quinique, l'acide chlorogénique (DUQUENOIS, 1961), la cynarine possède *in vitro*, aux doses de 0,025 à 1‰, un effet antibactérien vis-à-vis de germes gram positif et négatif (fig. n° XXIV). Il est à noter que la cynarine seule possède une action spécifique vis-à-vis de *Shigella dissenteriae* et *Salmonella paratyphi A*. Bien que cette activité ne se manifeste plus *in vivo*, la molécule présente encore dans ces conditions, une activité antivirale vis-à-vis du virus de l'influenzea P.R.8. (POLLIKOFF, LIBERMANN, COHRAN, PASCALE, 1965).

Si à la lumière de ces résultats, on peut considérer l'ester dicaféyl-1,4 quinique comme l'un des principes actifs les plus importants, responsable en particulier des propriétés cholérétiques attri-

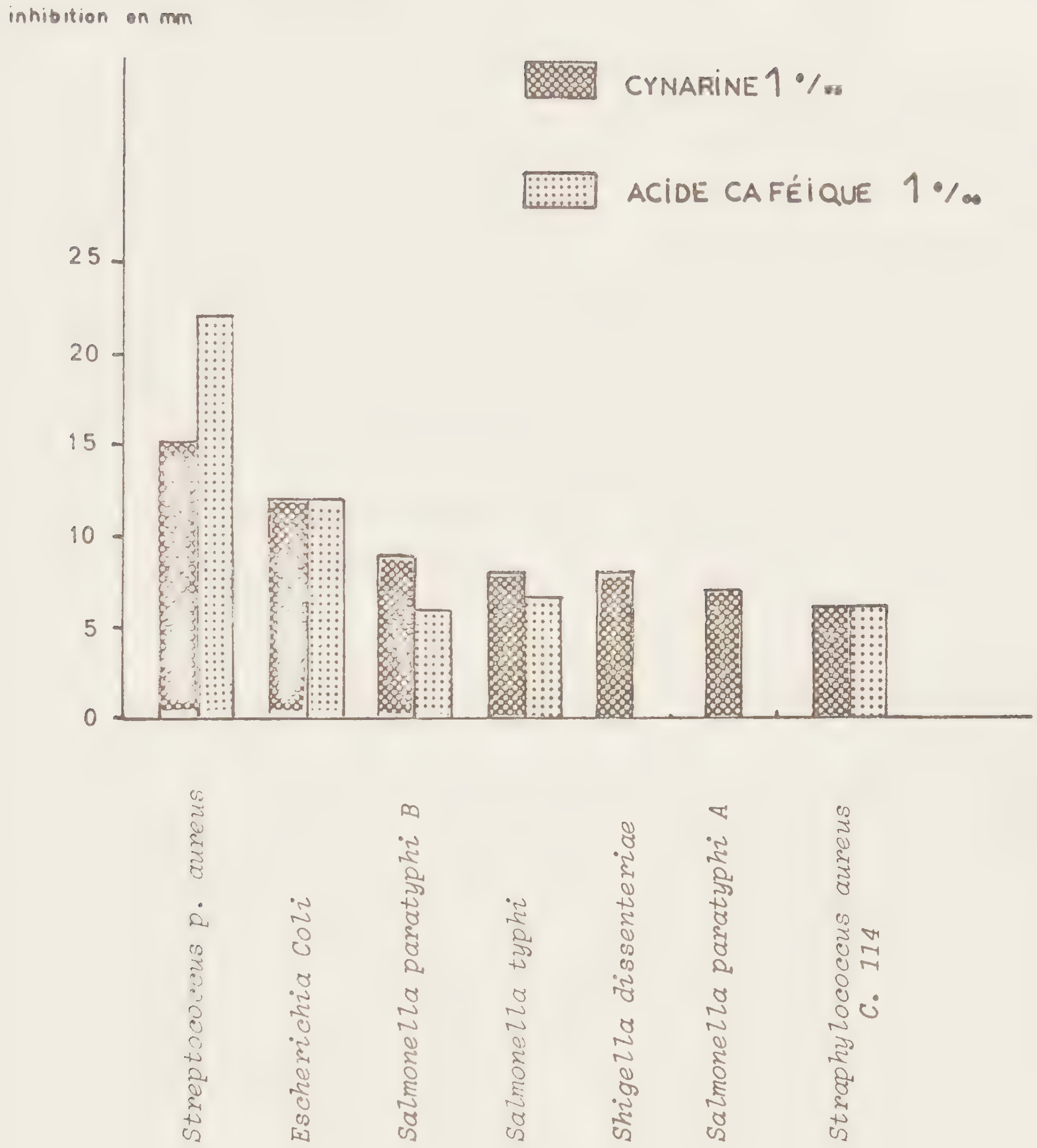



Figure n° XXIV : Comparaison de l'action antibactérienne in vitro de la cynarine et de l'acide caféïque.

buées par la médecine populaire à l'Artichaut, il semble bien que l'action diurétique de la plante ne puisse lui être rapportée.

Dès lors, on peut se demander si les acides citrique, glycérique, glycolique, fumarique, lactique, malique, succinique et hydroxyméthylacrylique isolés de la plante par les méthodes d'extraction précédemment décrites, n'interviendraient pas également pour renforcer l'activité pharmacologique de la cynarine et expliquer en particulier les propriétés diurétiques de l'Artichaut.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris l'étude pharmacologique du bloc "acide" de l'Artichaut en collaboration avec MORTIER (1972).

B - Action des acides alcools sur les microorganismes

Etant donné que l'acide acrylique, trouvé en forte proportion dans certaines algues vertes marines, possède une action antibactérienne (GLOMBITZA, 1970), il nous a semblé intéressant de rechercher si l'acide hydroxyméthylacrylique qui ne se différencie de cette molécule que par le remplacement d'un hydrogène par une fonction alcool primaire, présentait les mêmes caractéristiques.

Afin de le vérifier, nous avons essayé de mettre en évidence la toxicité de l'acide hydroxyméthylacrylique vis-à-vis de quelques bactéries d'une part et de quelques champignons levuriformes d'autre part. Enfin, dans le cas où une action antibactérienne ou fongistatique a été observée, nous avons tenté de voir si celle-ci était renforcée par la présence des autres acides contenus dans le bloc acide d'Artichaut.

1) <u>Action sur les bactéries</u>

a) Technique

Le pouvoir bactériostatique de l'acide hydroxyméthylacrylique a été apprécié sur les souches des espèces suivantes : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (coli J), *Staphylococcus aureus* (Oxford) et *Streptococcus aureus*.

Les différentes souches bactériennes sont cultivées en boîte de pétri, sur milieu classiquement utilisé en microbiologie et qui est constitué par du bouillon de viande additionné de gélose.

Après étalement de la suspension bactérienne à la surface de la gélose, nous avons placé des pastilles de papier filtre de 10 mm de diamètre sur lesquelles ont été déposées au préalable des quantités données de solution aqueuse de sel de sodium de l'acide hydroxyméthylacrylique. Toutes les boîtes ainsi préparées sont alors mises à incuber à l'étuve à 37°C.

L'évolution des cultures est suivie régulièrement pendant une semaine par des observations journalières.

b) Résultats

L'action inhibitrice de l'acide hydroxyméthylacrylique sur la croissance des bactéries envisagées est appréciée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition mesuré sur chaque boîte de pétri au bout d'une semaine.

Dans ces conditions, l'hydroxyméthylacrylate de sodium présente à dose très élevée (dépôt de 175 µg) une faible action antibactérienne vis-à-vis des germes précédemment cités. Il faut toutefois signaler que le *Streptococcus aureus* semble le germe le plus sensible à

cet acide ; le diamètre de la zone d'inhibition étant dans ce cas de 15 mm alors qu'il ne dépasse pas 3 mm pour les autres germes. Il faut d'ailleurs remarquer que cette action est renforcée par la présence des acides malique, citrique et succinique, qui, essayés seuls sont totalement dépourvus d'activité bactériostatique.

## 2) Action sur les levures

Notre étude porte sur les quatre espèces suivantes : *Rhodotorula sp.*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Cryptococcus neoformans*.

### a) Technique

Afin d'apprécier l'effet toxique de l'acide hydroxyméthylacrylique sur les différentes levures, nous avons eu recours à la méthode des antibiogrammes déjà utilisée dans le cas des bactéries étudiées précédemment.

Les levures sont mises en suspension dans le milieu gélosé et maltosé additionné de tifomycine. Le tout est alors coulé en boîte de pétri. Comme précédemment, à la surface de la gélose solidifiée, nous avons placé des pastilles de papier filtre de 10 mm de diamètre sur lesquelles ont été déposées au préalable des quantités connues de solution aqueuse d'acide hydroxyméthylacrylique, dont le pH est fixé à 4.

Les boîtes de pétri sont mises à incuber à l'étuve à 24°C et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance des levures est mesuré journellement pendant 15 jours.

b) Résultats

Dans ces conditions, on constate que l'acide hydroxyméthylacrylique à dose élevée (175 µg) inhibe légèrement le développement des levures suivantes : *Cryptococcus neoformans* et *Rhodotorula sp.*. Il n'est par contre pas toxique ni pour *Candida tropicalis* ni pour *Candida albicans*. Il est à noter que dans ce cas, l'action de l'acide hydroxyméthylacrylique n'est pas renforcée par les acides malique, citrique et succinique.

3) Conclusions

L'acide hydroxyméthylacrylique présente une faible action toxique vis-à-vis de quelques bactéries et de quelques levures, il semble qu'il puisse contribuer à renforcer les effets antibactériens de la cynarine. Toutefois, ces activités antibactériennes et antifongiques restent faibles, sauf en ce qui concerne le Streptocoque. Faut-il penser que cette bactérie possède une activité succinyl-déshydrogénasique très importante, que l'acide hydroxyméthylacrylique viendrait inhiber ?

En revanche, des essais effectués par nous sur les propriétés antibactériennes et antifongiques de l'acide méthylacrylique ont révélé un très fort pouvoir toxique.

## C - Action des acides alcools sur les animaux supérieurs

### 1) Etude de la toxicité

Nous avons débuté notre étude par une exploration rapide de la toxicité aigüe de l'acide hydroxyméthylagrylique, ainsi que des mélanges naturel et artificiel des acides organiques présents dans la plante, puis de la toxicité à moyen terme de l'extrait naturel d'Artichaut.

#### a) Etude de la toxicité aigüe

##### (1) Détermination des DL 50

Les DL 50 ont été déterminées chez les rats de souche "WISTAR", d'un poids moyen de 220 g, par la méthode de REED et HUENCH, dite des totaux cumulatifs. Pour cela, des lots de 10 animaux ont reçu par voie intr a péritonéale, des quantités croissantes des différents produits sous forme de sel de sodium. Lorsque la mort n'est pas survenue dans les 36 heures qui suivent l'administration du produit, la survie des animaux surveillés pendant 15 jours a été de règle.

##### α. Détermination de la DL 50 de l'acide hydroxyméthylacrylique

Nous avons utilisé une solution d'acide hydroxyméthylacrylique à 2 % : la DL 50 peut être fixée à 650 mg/kg (tableau n° 18 ).

##### β. Détermination de la DL 50 de l'extrait butanolique d'Artichaut

La DL 50 du "Bloc acide" de l'Artichaut est déterminée en

A

| DOSE ADMINISTREE en mg/kg | VIVANTS | VIVANTS CUMULES | MORTS | MORTS CUMULES |
|---|---|---|---|---|
| 200 | 10 | 27 | 0 | 0 |
| 400 | 8 | 17 | 2 | 2 |
| 600 | 6 | 9 | 4 | 6 |
| 800 | 3 | 3 | 7 | 13 |
| 1000 | 0 | 0 | 10 | 23 |

B

| DOSE ADMINISTREE en mg/kg | VIVANTS | VIVANTS CUMULES | MORTS | MORTS CUMULES |
|---|---|---|---|---|
| 400 | 10 | 25 | 0 | 0 |
| 600 | 8 | 15 | 2 | 2 |
| 800 | 5 | 7 | 5 | 7 |
| 1000 | 2 | 2 | 8 | 15 |
| 1500 | 0 | 0 | 10 | 25 |

Tableau n° 18 : Détermination de la DL 50 de l'acide hydroxyméthyl-acrylique (A) et de la DL 50 de l'extrait butanolique d'Artichaut (B) selon la méthode de REED et HUENCH (totaux cumulatifs).

injectant par voie intrapéritonéale la solution aqueuse résultant de la reprise du résidu d'évaporation des liqueurs butanoliques, et dont le pH est fixé à 7 par addition de bicarbonate de sodium.

La grande hydrosolubilité des sels d'acides organiques ainsi préparés permet d'en injecter, sous des volumes réduits, des quantités importantes.

On constate également dans ce cas, que si la mort n'a pas lieu dans les 36 heures qui suivent l'injection, la survie des animaux est de règle. Les résultats rassemblés dans le tableau n° 18 permettent ainsi de fixer la DL 50 du "Bloc acide" de l'Artichaut à 800 mg/kg.

γ. Détermination de la DL 50 du "Bloc acide" reconstitué

Pour en déterminer la DL 50, nous avons dissous dans 1 $cm^3$ d'eau distillée, en quantités égales à celles existant dans l'extrait butanolique d'Artichaut obtenu après hydrolyse acide de la plante (voir p.114-120), les acides citrique, fumarique, hydroxyméthylacrylique, lactique, malique et succinique. Les acides glycérique et glycolique étant en très faible quantité dans l'extrait naturel, nous les avons volontairement négligés. Dans ces conditions, la DL 50 trouvée est de 800 mg/kg, comme pour l'extrait naturel.

(2) Etude clinique des animaux ayant reçu des doses léthales ou subléthales d'acide hydroxyméthylacrylique ou du "Bloc acide" naturel ou "recomposé"

Dès les 2 ou 3 minutes qui suivent l'injection de doses mor-

telles ou voisines de la mortalité, il apparait chez les animaux des incidents ventilatoires caractérisés principalement par des bouffées d'hyperpnée suivies de pauses, s'apparentant à un rythme de CHEYNES-STOCKES. Les animaux s'immobilisent et semblent prostrés. Vers la cinquième minute, une vasodilatation périphérique apparait, traduite par une rougeur excessive des oreilles.

Vers la dixième minute, les incidents ventilatoires s'expriment par un rythme de CHEYNES-STOKES typique, la bradypnée est ensuite très importante (30 ventilations par minute, en moyenne, au lieu de 120 à 150 chez les animaux témoins). Les rats ont tendance à perdre l'équilibre et à tomber sur le côté, bien que le décubitus latéral ne puisse être obtenu. On constate alors une hyperthermie relative (40, 1°C), une hyper-esthésie, une hyperacousie. L'hypoventilation bientôt s'aggrave avec apparition de cyanose et la mort survient généralement au bout de 12 à 36 heures.

Lorsque des doses non mortelles sont administrées(200 à 400 mg/kg), le tableau clinique est assez voisin de celui-ci, mais les symptômes sont plus discrets. On constate cependant, dans les cinq minutes qui suivent l'injection, des phénomènes d'excitation, la mobilité étant très augmentée. Les animaux claquent des dents et sont agités de secousses cloniques sporadiques, acoompagnant une vive réaction pilomotrice. Ces phénomènes régressent avec le temps puis disparaissent et les animaux ne semblent en rien affectés par la suite.

Les rats morts lors de la détermination de la DL 50 ont été autopsiés. Aucune lésion macroscopique n'a été systématiquement remarquée ; on peut quelquefois signaler un état congestif des poumons, et une cyanose des organes hématopoiétiques.

Les animaux ayant reçu des doses non mortelles, et que l'on a sacrifiés, n'ont jamais montré de lésions macroscopiques d'un quelconque organe.

b) Toxicité à moyen terme de l'extrait butanolique d'Artichaut

(1) Mode opératoire

Etant donnés les résultats fournis par les déterminations des DL 50 de l'acide hydroxyméthylacrylique et des extraits acides, naturel ou artificiel, d'Artichaut, nous avons retenu pour l'étude de la toxicité à moyen terme, l'extrait naturel d'Artichaut.

Celui-ci débarrassé du butanol, puis salifié par une solution de bicarbonate de sodium, a été administré à des rats mâles et femelles par intubation de 1 $cm^3$ du produit, correspondant aux doses de 50 et 100 mg/kg, une fois par jour, 5 jours par semaine et pendant un mois.

Les lots d'animaux en expérience ont été constitués de la manière suivante :

| | |
|---|---|
| un lot de 5 rats mâles : | témoins |
| un lot de 5 rats femelles : | témoins |
| un lot de 10 rats mâles : | essais 50 mg/kg |
| un lot de 10 rats femelles : | essais 50 mg/kg |
| un lot de 10 rats mâles : | essais 100 mg/kg |
| un lot de 10 rats femelles : | essais 100 mg/kg |

Les rats, une fois acclimatés aux conditions de vie de l'animalerie pendant 15 jours, ont reçu le produit aux doses indiquées ci-

dessus pendant un mois, et ont été surveillés pendant le mois suivant. La prise de nourriture a été appréciée régulièrement et les animaux ont été pesés périodiquement. La numération et la formule sanguine ont été déterminées avant le début des administrations, toutes les semaines pendant le premier mois d'essais et enfin 15 jours après l'arrêt du traitement.

### (2) Résultats

Aucune mort n'ayant été enregistrée pendant cette étude, nous analyserons tout d'abord les variations de prise de poids puis les variations de la numération globulaire et de la formule sanguine consécutives à l'administration du produit chez les rats des deux sexes.

#### α. Variations de la courbe de prise de poids

L'évolution de la prise de poids étant différente chez les mâles et les femelles, les courbes ont été établies pour les animaux de chaque série. Un ralentissement de la prise de poids est surtout manifeste à la dose de 100 mg/kg, chez les rats mâles ; il n'y a pas toutefois amaigrissement spectaculaire des animaux. Les femelles paraissent moins affectées. Après l'arrêt de l'administration du produit, les prises de poids deviennent tout à fait comparables (figures n° XXV et XXVI).

#### β. Variations sanguines

Les animaux mâles et femelles ayant des numérations globulaires

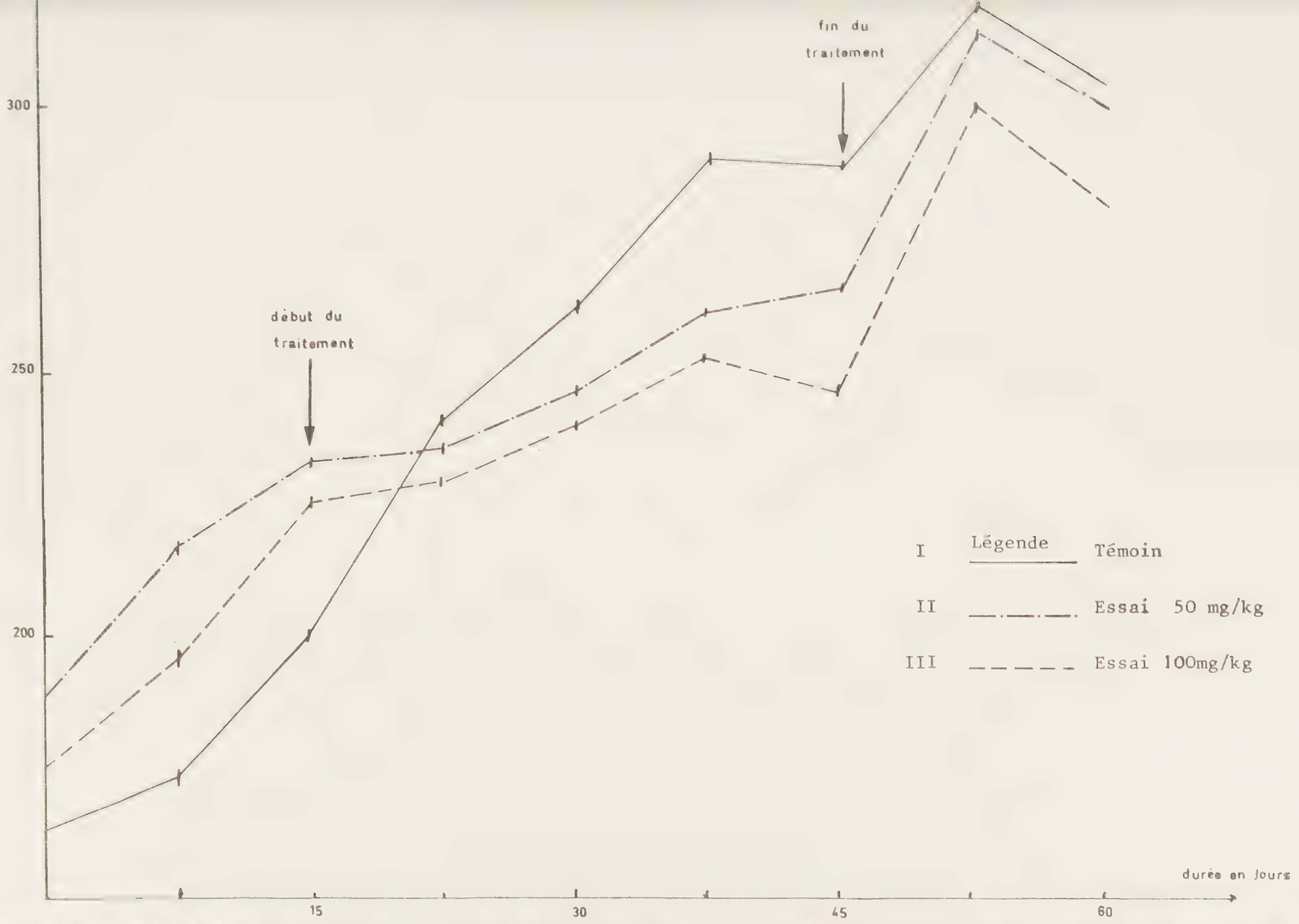



Figure n° XXV : Evolution des courbes de poids de lots de rats mâles, (I) témoins, (II) rats recevant par voie orale 50 mg/kg du bloc acide d'Artichaut par jour pendant 1 mois, (III) rats recevant dans les mêmes conditions 100 mg/kg du produit

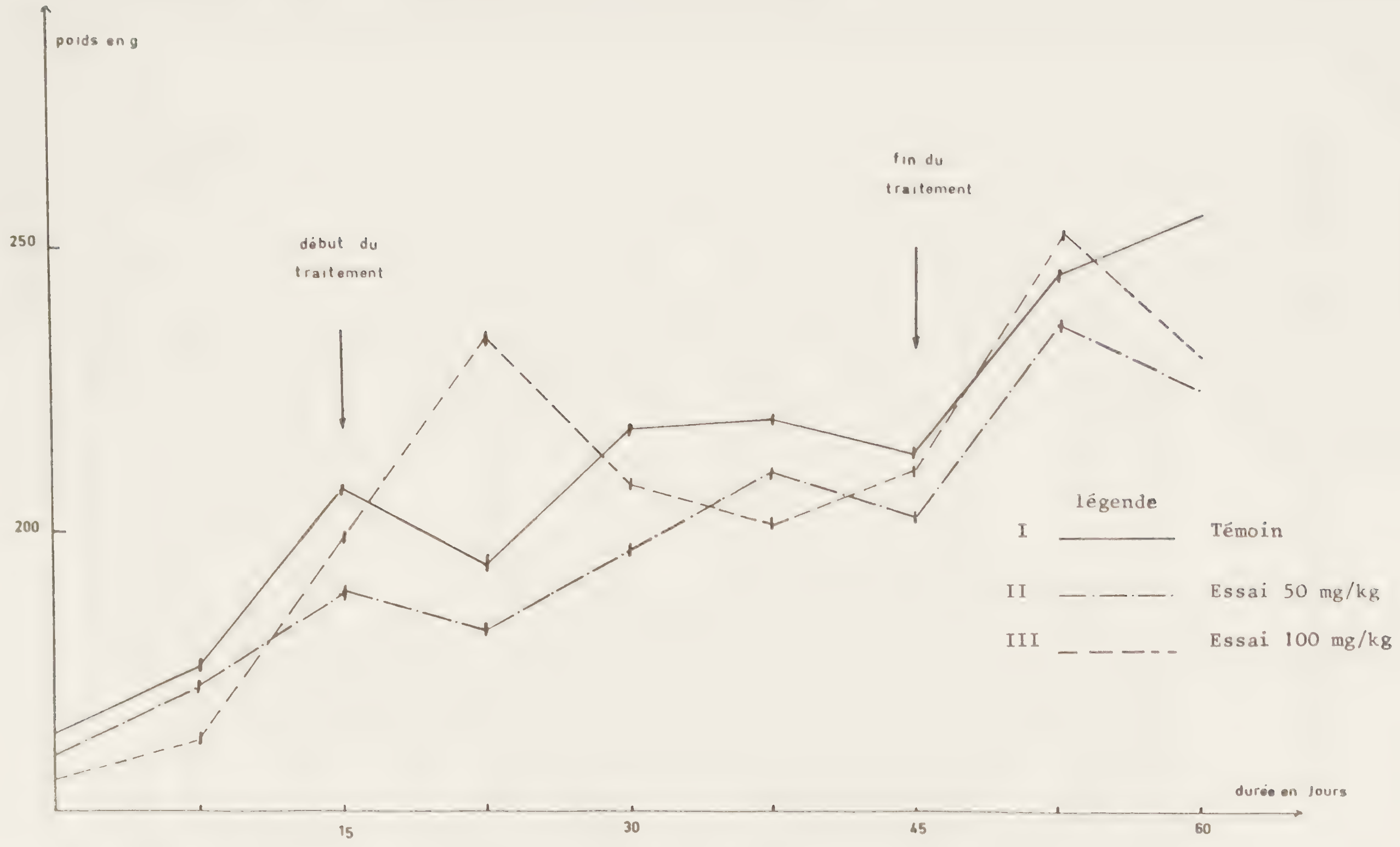



Figure n°XXVI: Evolution des courbes de poids de lots de rats femelles, (I) témoins, (II) rats recevant par voie orale 50 mg/kg du bloc acide d'Artichaut par jour pendant un mois, (III) rats recevant dans les mêmes conditions 100 mg/kg du produit.

comparables, nous n'avons pas fait de distinction entre eux et exprimons les résultats globaux.

☐ Globules rouges

Aucune modification significative n'a été constatée à la dose de 100 mg/kg. Une légère hyperglobulie pourrait être soupçonnée.

☐ Globules blancs

Une tendance à l'augmentation des globules blancs est remarquée vers la fin de l'administration du produit à la dose de 100 mg/kg aussi bien chez les mâles que chez les femelles, mais elle est peu significative. De toute façon, 15 jours après l'arrêt de l'administration du produit, le nombre de globules blancs des animaux des différents lots est très voisin.

☐ Variation de la formule sanguine

Aucune modification du nombre et de l'aspect des différents éléments n'est observée chez les animaux traités qui sont comparables aux animaux témoins. Les résultats généraux sont exprimés dans le tableau n° 19 .

### (3) Conclusions

Il a fallu administrer, par voie intra péritonéale, des quantités élevées de sels de sodium des acides organiques de l'extrait butanolique d'Artichaut, sous un faible volume (les solutions étant très hypertoniques) pour obtenir la mort des animaux. La DL 50 dans ces conditions a été fixée à 800 mg/kg par voie intra péritonéale. L'incidence centrale du produit sur la ventilation est manifeste ; des

| Avant<br>inistration | NUMERATION | | FORMULE LEUCOCYTAIRE | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | GR (x10[6]) | GB (x10[4]) | Polynucl. % neutro. | Polynucl. % éosino. | Lympho. % | Mono. % |
| | 8,5 ± 0,75 | 1,12 ± 0,15 | 24,5 ± 5,5 | 2,9 ± 1,6 | 71 ± 5 | 1,5 ± 0,7 |
| 100 mg/kg | 8,5 ± 1,1 | 1,30 ± 0,25 | 21,9 ± 7,5 | 2,7 ± 2,5 | 74 ± 6,5 | 0,9 ± 0,4 |
| 100 mg/kg | 8,0 ± 0,55 | I,10 ± 0,9 | 22,9 ± 6,0 | 3,1 ± 2,5 | 71,5 ± 7 | 1,0 ± 0,8 |
| 50 mg/kg | 8,9 ± 1,4 | 1,30 ± 0,15 | 24,5 ± 7 | 2,3 ± 2,2 | 73,1 ± 7 | 0,6 ± 0,4 |
| 50 mg/kg | 8,6 ± 1,1 | 1,14 ± 0,21 | 24 ± 1,3 | 2,2 ± 1 | 72,8 ± 4 | 1,3 ± 0,4 |
| e semaine | | | | | | |
| | 8,6 | 1,1 | 22,5 | 3,5 | 72 | 1,5 |
| 100 | 9,2 | 1,35 | 20 | 1,5 | 77 | 1,5 |
| 100 | 7,95 | 1,30 | 27 | 1,5 | 69,5 | 2 |
| 50 | 8,7 | 1,05 | 25 | 2,5 | 71 | 1,5 |
| 50 | 8,6 | 1,28 | 28 | 0,5 | 70 | 1,5 |
| e semaine | | | | | | |
| | 8,75 | 1,22 | 23,5 | 2 | 72,5 | 2 |
| 100 | 9,27 | 1,50 | 25 | 2 | 72 | 1 |
| 100 | 10,50 | 1,41 | 27,5 | 3,5 | 67,5 | 1,5 |
| 50 | 8,50 | 0,98 | 24 | 4 | 69,5 | 2,5 |
| 50 | 8,8 | 1,0 | 21,5 | 2,5 | 72,5 | 3,5 |
| trôle | | | | | | |
| | 8,64 | 1,16 | 23 | 1 | 74 | 2 |
| 100 | 10,01 | 1,24 | 25 | 2,5 | 70,5 | 2 |
| 100 | 8,05 | 1,20 | 24 | 2 | 72,5 | 1,5 |
| 50 | 8,20 | 0,92 | 22 | 1 | 74 | 3 |
| 50 | 8,7 | 0,98 | 27 | 2 | 68 | 3 |

Tableau n°19 : Variations de la formule et de la numération sanguines chez les rats recevant les sels de sodium des acides organiques de l'extrait butanolique d'Artichaut pendant un mois par voie orale.

bradypnées avec rythme CHEYNES-STOKES entraînent des cyanoses importantes des animaux. D'autre part, l'administration de doses de 50 et 100 mg/kg, par voie orale, pendant un mois n'a pas entraîné de grandes modifications des constantes hématologiques de l'animal. Un ralentissement de la prise de poids a été remarqué pour une forte dose ; il pourrait être en rapport avec une diminution de la prise de nourriture et une diurèse qui a semblé fort augmentée. Après l'arrêt de l'administration du produit, les animaux sont apparus parfaitement normaux.

### 2) Effets vis-à-vis du foie

#### a) Effet cholérètique

Comme lors de la recherche des propriétés cholérètiques de la cynaropicrine, l'expérimentation est pratiquée sur des rats mâles de souche "WISTAR" d'un poids moyen de 200 à 250 g, à jeûn depuis 18 heures. La cathétérisation du canal cholédoque est réalisée sur des animaux anesthésiés à l'uréthane à raison de 1,4 g/kg, par voie intr apéritonéale. La bile est alors recueillie dans une pipette de 1 $cm^3$, graduée au 1/100 ; les lectures étant faites toutes les 15 minutes à partir du moment où le débit biliaire de base est constant.

Lorsque la cholérèse de base est stable, les animaux répartis en deux lots reçoivent respectivement les uns une solution physiologique de chlorure de sodium à raison de 0,5 $cm^3$ pour 200 g de poids d'animal, les autres, l'un des différents produits dont nous voulons tester l'activité cholérètique.

Nous analyserons en premier lieu, les effets de l'acide

hydroxyméthylacrylique sur le débit biliaire, puis ceux observés à la suite de l'administration du mélange naturel ou artificiel des acides organiques présents dans les feuilles d'Artichaut.

### (1) Acide hydroxyméthylacrylique

Alors que le débit biliaire de base des animaux témoins recevant la solution isotonique de chlorure de sodium n'est pas modifié (moyenne des débits biliaires de 15 animaux = 0,13 $\pm$ 0,01 $cm^3$ avant et après injection du produit), l'hydroxyméthylacrylate de sodium en solution aqueuse à la dose de 40 mg/kg provoque dès le premier quart d'heure, une légère augmentation du flux biliaire. Ce phénomène se poursuit jusqu'à la demi-heure, puis la cholérèse se stabilise pour revenir à son débit de base en une heure.

L'acide hydroxyméthylacrylique possède donc à la dose de 40 mg/kg une faible action cholérètique directe. Cette constatation est encore plus frappante après administration de 100 mg/kg du produit. Le retour de la cholérèse à la normale demande alors plus de deux heures, tandis que le débit biliaire maximum est voisin de celui enregistré après injection de 40 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique (augmentation de l'ordre de 15 %).

### (2) Bloc acide naturel

Les animaux constituant le lot expérimental, reçoivent dans ce cas l'extrait butanolique d'Artichaut à la dose de 80 mg/kg privé de toutes traces de solvant organique par distillation sous pression réduite, puis salifié par du bicarbonate de sodium.

Dans ces conditions, aucune variation du débit biliaire

de base n'est enregistrée. Le mélange des acides organiques constituant cet extrait n'a donc pas d'action cholérètique directe.

③ Mélange des acides organiques ne comprenant pas l'acide hydroxyméthylacrylique

Afin de vérifier l'éventuelle action cholérètique des acides citrique, fumarique, glycérique, glycolique, malique et succinique qui constituent avec l'acide hydroxyméthylacrylique le "Bloc acide" de l'Artichaut, nous avons injecté, selon le mode opératoire précédent, des doses croissantes de chacun de ces acides préalablement salifiés. Dans ces conditions quel que soit l'acide utilisé, aucune hypercholérèse ne se manifeste. Il en est de même lorsque ces acides sont administrés en mélange. Les associations des acides précédemment cités par groupe de deux, trois, quatre, cinq ou six ne modifient en rien le débit biliaire de base.

④ Conclusions

Parmi les acides organiques présents dans les feuilles d'Artichaut, seul l'acide hydroxyméthylacrylique présente à la dose de 40 mg/kg une légère action cholérètique. Bien que contenant ce dérivé acrylique, l'extrait butanolique d'Artichaut à la dose injectée (80 mg/kg) ne la possède pas. Ce fait n'est d'ailleurs pas surprenant a priori, car la dose d'acide hydroxyméthylacrylique présente dans le mélange naturel des acides organiques injectés, est trop faible pour que l'action cholérètique de cet acide puisse se manifester.

Quoi qu'il en soit, et bien que l'acide hydroxyméthylacry-

lique ne réponde pas au premier critère de l'amphocholérèse définie par BOUCARD, à savoir que "toute substance amphocholérètique ne doit entraîner aucune variation du débit biliaire de base de l'animal", nous avons injecté le dérivé acrylique, puis l'extrait butanolique d'Artichaut et enfin les mélanges artificiels des acides organiques à des rats que l'on peut qualifier de "pathologiques" puisque leur cholérèse de base a été soit augmentée par l'injection de déhydrocholate de sodium, soit diminuée par l'injection d'azoture de sodium.

Nous voulions par là déterminer les effets "amphocholérètiques" de ces produits et de ces mélanges.

### b) Effets amphocholérètiques

Nous examinerons successivement les effets produits sur une hypercholérèse provoquée (dicholium) puis sur une hypocholérèse provoquée (azoture de sodium), selon le même protocole que celui que nous avons décrit lors de l'étude de la cynaropicrine.

#### (1) Acide hydroxyméthylacrylique

##### α. Action vis-à-vis d'une hypercholérèse provoquée

Des rats ayant une fistule biliaire temporaire reçoivent par voie intraveineuse 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium, dose qui paraît suffisante pour provoquer une augmentation franche de la cholérèse, vis-à-vis de laquelle l'effet amphocholérètique est aisément observable. En effet, pour des doses supérieures, l'intensité de la

réponse hypercholérétique est telle que les différents produits ne manifestent plus leur effet freinateur. A cette dose (10 mg/kg), le déhydrocholate de sodium provoque une augmentation de la cholérèse maximale au bout de la 15e minute qui suit l'injection du produit. A cet instant précis, la moyenne des débits biliaires des 15 animaux pris pour l'expérience est de 0,186 ± 0,005 $cm^3$. Cette hypercholérèse diminue par la suite et la secrétion biliaire revient à son débit initial au bout de 45 minutes.

On injecte alors à ce même lot d'animaux simultanément 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium et le sel de sodium de l'acide hydroxyméthylacrylique à la dose de 40 mg/kg. Dans ces conditions, on ne note aucune diminution de l'hypercholérèse par rapport à celle constatée lors de l'injection de déhydrocholate de sodium seul. Cette constatation n'est d'ailleurs pas en contradiction avec les résultats précédents puisque l'acide hydroxyméthylacrylique présente une légère activité cholérètique directe.

β. Action vis-à-vis d'une hypocholérèse provoquée

L'expérimentation nécessite alors deux lots de rats ; l'un témoin, l'autre essai, qui reçoivent respectivement :

☐ Premier lot (témoin)

Les animaux reçoivent 1 mg/kg d'azoture de sodium. On observe alors, dès le premier quart d'heure qui suit l'injection, une diminution rapide du flux biliaire.

Cette hypocholérèse se poursuit pendant la première heure, puis se stabilise, et revient finalement à la normale au bout de 3 heures, le pourcentage maximal de diminution enregistré étant voisin

de 27 %.

□ Deuxième lot (essai)

Les animaux reçoivent 1 mg/kg d'azoture de sodium, puis 10 minutes après 40 mg/kg d'hydroxyméthylacrylate de sodium. Dans ces conditions, la diminution du flux biliaire qui était de 27 % après injection d'azoture de sodium seul, n'est plus que de 8 %. L'acide hydroxyméthylacrylique semble donc antagoniser l'action hypocholérètique de l'azoture de sodium.

γ. Conclusions

A la lumière de la définition qu'a donné BOUCARD du phénomène d'amphocholérèse, il semble assez surprenant que l'acide hydroxyméthylacrylique s'oppose à l'action hypocholérètique de l'azoture de sodium, puisque cet acide alcool ne présente, par ailleurs,aucun effet "freinateur" de l'hypercholérèse provoquée par le déhydrocholate de sodium.

On tentera de trouver l'explication de ce phénomène lors de la discussion biochimique que nous ferons à la fin de cette étude pharmacologique car beaucoup de nos résultats semblent mettre en jeu des mécanismes intra-cellulaires complexes expliquant l'action thérapeutique de ce produit.

(2) Extrait butanolique d'Artichaut

α. Action vis-à-vis de l'hypercholérèse provoquée

Comme précédemment, après avoir apprécié la réponse hypercholérètique de 15 rats mâles provoquée par 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium, on administre simultanément à ces mêmes animaux, 10 mg/kg

de déhydrocholate de sodium et 80 mg/kg d'extrait butanolique d'Artichaut préalablement privé de son butanol et salifié par du bicarbonate de sodium.

Une nette diminution de l'hypercholérèse normalement provoquée par le déhydrocholate de sodium seul est alors enregistrée, les moyennes des débits biliaires au bout de la 15e minute étant respectivement de 0,186 ± 0,005 $cm^3$ après injection de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium et de 0,160 ± 0,004 $cm^3$ après injection de la même dose de déhydrocholate de sodium et de 80 mg/kg d'extrait butanolique d'Artichaut.

Ces résultats permettraient donc d'attribuer cette fois à l'extrait butanolique d'Artichaut des propriétés amphocholérètiques. Elles doivent cependant être vérifiées vis-à-vis d'animaux non plus en hypercholérèse, mais en hypocholérèse.

β. Action vis-à-vis de l'hypo cholérèse provoquée

L'expérimentation conduite comme précédemment nécessite toujours deux lots de rats mâles en fistule biliaire temporaire auxquels on injecte

au premier lot :

1 mg/kg d'azoture de sodium, ce qui provoque une diminution maximale du flux biliaire de - 27 %.

au deuxième lot :

1 mg/kg d'azoture de sodium, puis 10 minutes après l'extrait d'Artichaut à raison de 80 mg/kg. La chute du débit biliaire est alors

moins importante : elle n'atteint que - 9 %. Cette action antagoniste de l'extrait butanolique est surtout manifeste pendant la première demi-heure qui suit l'injection du produit, le flux biliaire se stabilisant ensuite pour revenir à sa valeur normale 60 minutes après l'injection. Ces résultats sont consignés dans le tableau n° 20 .

γ. Conclusions

L'extrait de *Cynara scolymus* obtenu après hydrolyse acide de la plante a donc a priori des propriétés amphocholérètiques. Il reste maintenant à préciser les constituants responsables de cette action pharmacologique.

Dans ce but, nous avons tenté de séparer les acides organiques autres que l'acide hydroxyméthylacrylique susceptibles de posséder une telle action amphocholérètique.

(3) Les acides organiques autres que l'acide hydroxyméthylacrylique présents dans l'extrait d'Artichaut

Afin de définir leur activité hépatique, les acides citrique, fumarique, glycérique, glycolique, lactique, malique et succinique, commercialisés par les laboratoires MERCK, ont été essayés seuls, puis en mélange.

α. Action vis-à-vis de l'hypercholérèse provoquée

L'hypercholérèse étant comme d'habitude induite par l'injection intraveineuse de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium, les acides témoins

| Produits administrés | Variations en % du débit biliaire | | |
|---|---|---|---|
| | 30 minutes après l'injection | 60 minutes après l'injection | 120 minutes après l'injection |
| Extrait d'Artichaut (80 mg/kg) | 0 | 0 | 0 |
| Azoture de sodium (1 mg/kg) | - 27 | - 18 | - 9 |
| Azoture de sodium (1 mg/kg) + Extrait d'Artichaut (80 mg/kg) | - 9 | 0 | + 10 |

Tableau n° 20 : Variations (en %) du débit biliaire de rats provoquées par l'injection des différents produits intervenant dans le test d'hypocholérèse défini par BOUCARD et permettant ainsi de mettre en évidence pour l'extrait d'Artichaut des propriétés amphocholérètiques.

sont successivement testés aux doses suivantes :

- acide seul : 40 mg/kg
- mélange de deux acides : 20 mg/kg aa
- mélange de trois acides : 13,3 mg/kg aa
- mélange de quatre acides : 10 mg/kg aa
- mélange de cinq acides : 8 mg/kg aa
- mélange de six acides : 6,6 mg/kg aa

Dans ces conditions, la quantité totale administrée, quel que soit le nombre des composants de l'association, est de 40 mg/kg.

Les résultats exprimés dans le tableau n° 21 montrent qu'aucune diminution de l'hypercholérèse par rapport à celle provoquée par le déhydrocholate de sodium seul, n'est observée lors de l'injection simultanée de 40 mg/kg d'un acide et de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium. Il en est de même lorsque la dose d'acide administrée est de 80 mg/kg.

L'association de deux acides (20 mg/kg aa) n'agit pas davantage. Cependant le mélange : acide malique - acide succinique injecté cette fois à la dose de 400 mg/kg freine déjà l'augmentation de la cholérèse de 10 %.

L'action antagoniste atteint son maximum avec l'association tertiaire suivante : acides malique - citrique - succinique (13,3 mg/kg aa). L'addition au mélange précédent des acides glycérique et glycolique à la dose de 13,3 mg/kg pour chacun d'eux ne modifie pas le phénomène.

Quant aux mélanges suivants : acides malique - succinique - citrique - glycérique (10 mg/kg aa) d'une part, et acides malique - succinique - citrique et glycolique (10 mg/kg aa) d'autre part, ils ne répriment que faiblement l'hypercholérèse provoquée.

| PRODUITS ADMINISTRES | HYPERCHOLERESE |
|---|---|
| Acides seuls<br>(40 mg/kg - 80 mg/kg) | 100 % |
| Association de deux acides<br>(20 mg aa/kg)<br>ac. malique + ac. succinique | 100 % |
| Association de trois acides<br>(13,3 mg aa/kg)<br>ac. malique + ac. succinique + ac. citrique | 85 % |
| Association de quatre acides<br>(10 mg aa/kg)<br>ac. malique + ac. succinique + ac. citrique + ac. glycolique | 94 % |
| (10 mg aa/kg)<br>ac. malique + ac. succinique + ac. citrique + ac. glycérique | 93 % |

Tableau n° 21 : Augmentation de la cholérèse enregistrée chez le rat après injection simultanée de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium et de 40 mg/kg d'un ou de plusieurs acides (résultats exprimés en % par rapport à l'effet dû à l'injection de 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium).

Les mêmes constatations peuvent être faites après injection du mélange des six acides (6,6 mg/kg aa)

β. Action vis-à-vis de l'hypocholérèse provoquée

Nous avons vérifié l'action des acides vis-à-vis de l'azoture de sodium administré par voie intraveineuse à raison de 1 mg/kg. L'expérimentation nécessite toujours les deux lots d'animaux : témoin (azoture de sodium) et essai (azoture de sodium + produits essayés 10 minutes après). Les différents acides organiques ont tout d'abord été injectés seuls, puis en mélange binaire, tertiaire et quaternaire.

Aucune activité antagoniste vis-à-vis de l'azoture de sodium ne se manifeste avec les acides pris séparèment ainsi qu'avec les mélanges binaires. Comme précédemment, la méthode par tatonnement démontre à nouveau que seul le mélange : acides malique - succinique - citrique est efficace.

γ. Conclusions

D'après ces expériences, il semble que l'action régulatrice sur le foie de l'extrait butanolique d'Artichaut dépende des associations de certains acides privilégiés. C'est ainsi que seul le bloc acide malique, citrique - succinique semble intervenir dans l'action amphocholérètique de l'extrait d'Artichaut.

L'étude des associations d'acides ne peut cependant s'arrêter là. En effet, l'analyse chimique de l'extrait nous a permis d'identifier à côté de molécules issues de la glycolyse et du cycle de Krebs, un acide particulier : l'acide hydroxyméthylacrylique. N'interviendrait-il pas pour renforcer l'action amphocholérètique du mélange acide

précédemment décrit ?

④ Potentialisation des effets amphocholérètiques par l'acide hydroxyméthylacrylique

α. Hypercholérèse provoquée

On injecte simultanément à l'animal 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium et l'un des différents mélanges figurant au tableau n° 22 . Comme le montre le tableau n° 22 , le mélange qui antagonise le mieux l'hypercholérèse provoquée est le mélange quaternaire : acides malique - succinique - citrique et hydroxyméthylacrylique. Il est à remarquer que l'addition d'acide glycolique au mélange précédent ne semble pas indispensable.

Nous pouvons remarquer (tableau n° 23 ) que les résultats obtenus sur un lot de 14 animaux traités par l'association des quatre acides suivants : acides malique - succinique - citrique et hydroxyméthylacrylique (10 mg/kg aa) est hautement significative, comme le montre la valeur moyenne, la variance, l'écart type et enfin le quotient de test.

β. Hypocholérèse provoquée

L'action de l'association des acides malique - succinique - citrique et hydroxyméthylacrylique devait être également vérifiée vis-à-vis de la diminution du flux biliaire, provoquée par l'azoture de sodium (1 mg/kg,i.v.*). Chacun des acides se trouvant dans le mélange cité plus haut, est donc injecté à la dose de 10 mg/kg.

L'action antagoniste des acides associés, vis-à-vis de l'hy-

*i.v. : intraveineuse

| ASSOCIATIONS D'ACIDES RENFERMANT L'ACIDE HYDROXYMETHYLACRYLIQUE EXPERIMENTES CHEZ LE RAT EN HYPERCHOLERESE | % D'AUGMENTATION DE LA CHOLERESE ENREGISTREE |
|---|---|
| Acides malique et H.M.A.* (20 mg aa/kg) | 100 % |
| Association des quatre acides (13,3 mg aa/kg) malique + succinique + citrique + H.M.A.* | 30 % |
| Association des cinq acides (8 mg aa/kg) malique + citrique + succinique + glycolique + H.M.A.* | 30 % |
| Association des six acides (6,6 mg aa/kg) malique + citrique + succinique + glycolique + glycérique + H.M.A.* | 30 % |

* H.M.A. : Acide hydroxyméthylacrylique

Tableau n° 22 : Augmentation de la cholérèse enregistrée chez le rat après injection simultanée de 10 mg/kg de déshydrocholate de sodium et de 40 mg/kg d'une association d'acides organiques renfermant l'acide hydroxyméthylacrylique (résultats exprimés en pourcentage par rapport à l'effet dû à l'injection de 10 mg/kg de déshydrocholate de sodium).

| DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION de 10 mg/kg de D.H.C.* | DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION SIMULTANEE de 10 mg/kg de D.H.C.* ET DE L'ASSOCIATION DES ACIDES |
|---|---|
| 0,19 | 0,17 |
| 0,18 | 0,15 |
| 0,19 | 0,16 |
| 0,19 | 0,16 |
| 0,17 | 0,15 |
| 0,20 | 0,15 |
| 0,19 | 0,16 |
| 0,19 | 0,16 |
| 0,19 | 0,15 |
| 0,18 | 0,16 |
| 0,19 | 0,16 |
| 0,19 | 0,17 |
| 0,20 | 0,17 |
| 0,18 | 0,15 |
| Moyenne : M = 0,188 | Moyenne : M = 0,159 |
| Variance 0,000064 | Variance 0,000059 |
| Ecart type 0,0080 | Ecart type 0,0077 |
| Quotient de test : 13,2 | |

* D.H.C. = déhydrocholate de sodium

Tableau n° 22 : Moyennes des débits biliaires obtenues sur un lot de 14 rats recevant en premier lieu 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium puis la même dose de déhydrocholate de sodium associée aux quatre acides ce qui montre que les résultats sont hautement significatifs.

pocholérèse (tableau n° 24 ) est surtout manifeste au cours de la première heure. Le pourcentage de diminution du débit biliaire qui est de 27 % après injection d'azoture de sodium seul, est de 8 % seulement lorsque cet hypocholérètique est injecté avec le mélange quaternaire. Dans ce cas, la chute du débit biliaire est stabilisée au bout de trente minutes et revient à sa valeur normale environ soixante minutes après l'injection, alors qu'après deux heures, la cholérèse des animaux témoins traités par l'azoture de sodium n'a toujours pas retrouvée sa valeur normale.

γ. Conclusions

Bien que l'acide hydroxyméthylacrylique ne manifeste par lui-même une action que vis-à-vis de l'hypocholérèse provoquée, cette molécule semble potentialiser les effets amphocholérétiques du mélange acides malique - succinique et citrique vis-à-vis non seulement de l'hypocholérèse provoquée, mais également vis-à-vis de l'hypercholérèse provoquée par le déhydrocholate de sodium.

Il semble donc bien nécessaire pour obtenir une action amphocholérètique significative.

3) <u>Effets vis-à-vis du rein</u>

a) Modification du débit urinaire

Le protocole expérimental étant identique à celui utilisé lors de l'étude de la cynaropicrine (page 23), nous rechercherons l'activité diurètique de l' acide hydroxyméthylacrylique et de l'extrait butanolique d'Artichaut, puis nous tenterons d'identifier les

| | 30 MINUTES APRES L'INJECTION | 60 MINUTES APRES L'INJECTION | 120 MINUTES APRES L'INJECTION |
|---|---|---|---|
| Lot témoin sol.physiol. de NaCl | + 2 | 0 | 0 |
| Lot témoin mélange d'acides | - 1 | 0 | 0 |
| Lot n° 1 azoture de sodium | - 27 | - 18 | - 9 |
| Lot n° 2 azoture de sodium + mélange des 4 acides | - 8 | 0 | + 8 |

Tableau n° 24 : Variations (en %) du débit biliaire de rats, provoquées par l'injection des différents produits intervenant dans le test d'hypocholérèse défini par BOUCARD permettant ainsi de mettre en évidence pour le mélange des quatre acides (acides malique, citrique, succinique et hydroxyméthylacrylique) des propriétés amphocholérètiques.

acides ou les mélanges d'acides responsables de cette activité.

### (1) Acide hydroxyméthylacrylique

Le dérivé acrylique sous forme de sel de sodium est injecté, dans la veine jugulaire d'un lapin dont les deux uretères ont été cathétérisées, à la même dose que celle qui nous a permis de déceler pour cette molécule une légère action cholérètique (40 mg/kg).

L'enregistrement graphique (figure n°XXVII) représente des triangles dont la base équivaut au temps mis par l'animal pour uriner 1,5 $cm^3$. Cela permet ainsi d'apprécier l'intensité de l'effet diurétique et la durée d'action du produit (voir page 25 ) et nous montre que l'acide hydroxyméthylacrylique provoque une augmentation de la diurèse de 42 % pour une durée d'action de 18 minutes 45 secondes.

### (2) Extrait butanolique d'Artichaut

L'extrait butanolique d'Artichaut débarrassé de toute trace de solvant organique par distillation sous pression réduite, puis salifié par une solution de bicarbonate de sodium à 10 % jusqu'à pH 7, est injecté comme précédemment dans la veine jugulaire du lapin à la dose de 40 mg/kg. Comme le montre l'enregistrement graphique (figure n° XXVIII)une nette augmentation de la diurèse est observée. En effet, pour une durée d'action de 24 minutes, l'accroissement du flux urinaire est de 135 %. Le bloc d'acides organiques qui constitue l'extrait butanolique d'Artichaut présente donc non seulement une action au niveau du foie, mais également une puissante action au niveau du rein. Restent maintenant à identifier les acides et acides

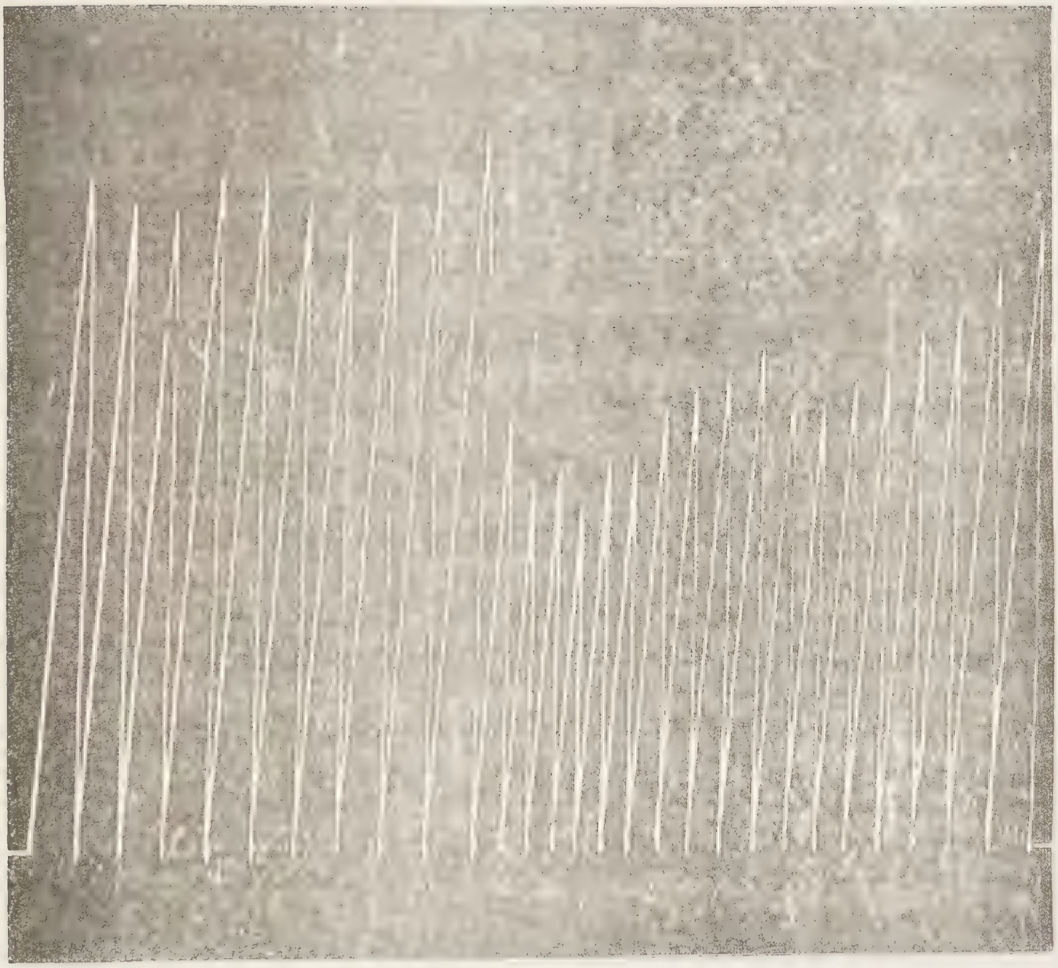


Figure n°XXVII : Enregistrement graphique de l'activité diurétique de l'acide hydroxyméthylacrylique injecté à la dose de 40 mg/kg dans la veine jugulaire d'un lapin.

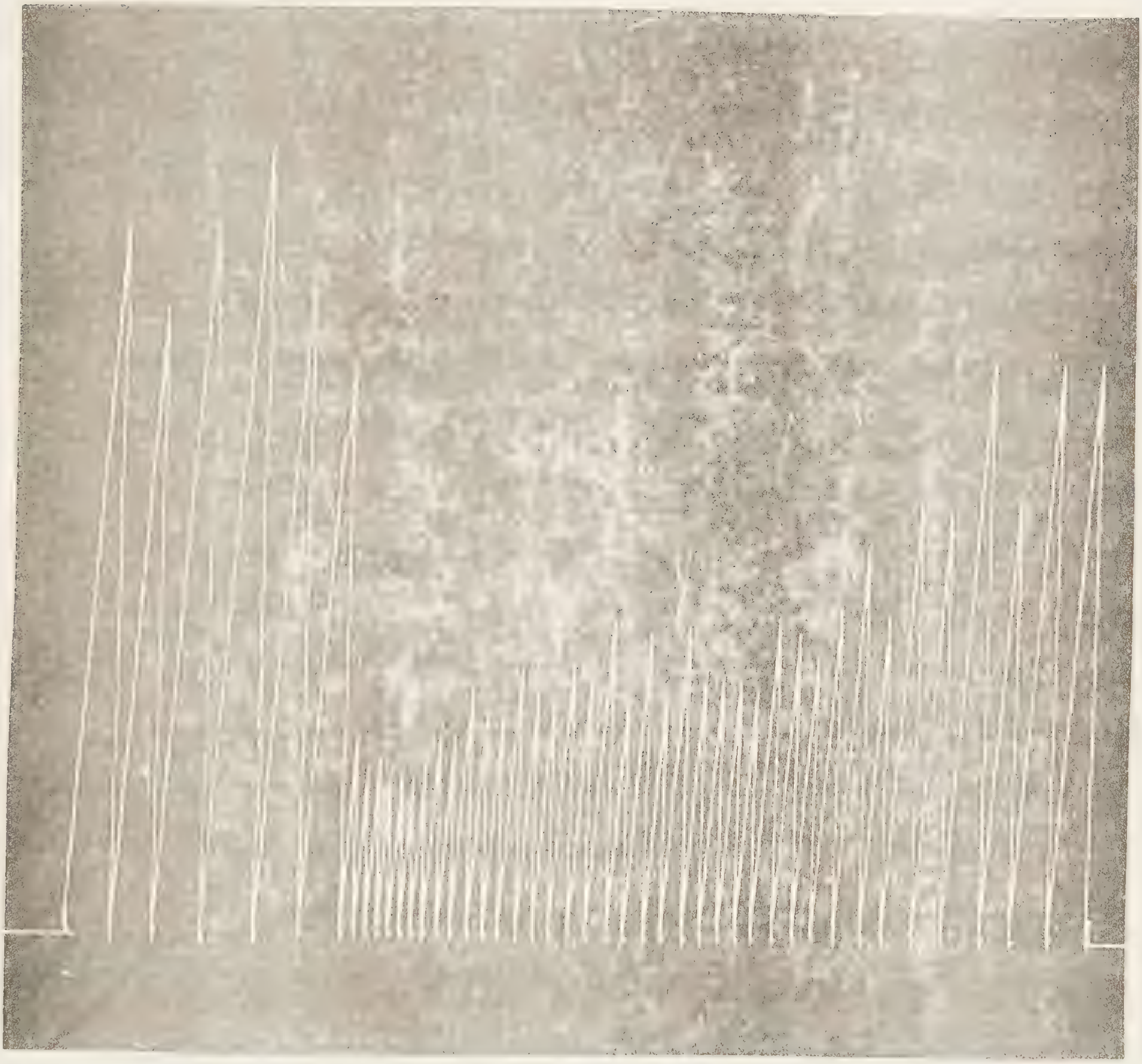


Figure n° XXVIII : Enregistrement graphique de l'activité diurétique de l'extrait butanolique d'Artichaut, injecté à la dose de 40 mg/kg dans la veine jugulaire d'un lapin.

alcools autres que l'acide hydroxyméthylacrylique qui pourraient être responsables de cette action diurétique ou y participer.

(3) Acides organiques autres que l'acide hydroxyméthylacrylique responsables de l'action diurétique de l'extrait butanolique d'Artichaut

Le protocole expérimental restant toujours le même, nous avons injecté par voie intraveineuse dans la jugulaire du lapin, les acides citrique, fumarique, glycérique, glycolique, lactique, malique et succinique d'abord séparément, puis en association.

Parmi les acides injectés séparément sous forme de sel de sodium, à la dose de 40 mg/kg, seuls l'acide glycérique et l'acide glycolique provoquent une augmentation de la diurèse : l'accroissement du flux urinaire étant pendant 10 minutes d'environ 50 %. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de BALANSARD (1952) qui avait décrit l'action diurétique de 50 mg/kg des sels de ces acides administrés par voie parenthérale à des lapins.

Nous avons alors essayé, puis comparé entre eux, plusieurs mélanges d'acides en association binaire, ternaire et quaternaire.

Parmi les mélanges binaires essayés, l'association acide glycérique - acide glycolique (20mg/kgaa) présente une action diurétique importante. Une augmentation du flux rénal de 88 % est ainsi enregistrée pour une durée d'action du produit de 23'45".

Cette constatation confirme à nouveau les observations de BALANSARD (1952) qui considérait que l'action hépato-rénale de l'Artichaut était dûe à ces deux acides. Si cette association est efficace,

elle ne peut cependant être entièrement responsable de l'activité diurétique. En effet, l'acide glycolique et plus particulièrement l'acide glycérique ne se trouvent qu'en très faibles quantités dans les différents extraits d'Artichaut analysés.

L'action diurétique des autres acides ne se manifeste qu'à partir des combinaisons ternaires. Parmi celles-ci, le mélange acides malique - citrique - succinique à la dose de 13,3 mg/kg aa présente une activité diurétique certaine, l'augmentation de la diurèse étant de 53 % pour une durée d'action de 11'45".

Indépendamment de l'acide hydroxyméthylacrylique qui présente comme nous l'avons vu une action sur le rein, les acides impliqués dans l'action diurétique de l'extrait butanolique d'Artichaut semblent être le mélange des acides malique , citrique et succinique. En effet, on doit en exclure les acides glycolique et glycérique qui bien que possédant en association une action diurétique beaucoup plus intense que le mélange précédemment cité, sont dans l'extrait butanolique d'Artichaut en trop faible quantité pour agir.

(4) Potentialisation des effets diurétiques des acides organiques par l'acide hydroxyméthylacrylique

Le protocole expérimental restant identique à celui décrit plus haut, nous avons testé l'activité diurétique de diverses associations d'acides comprenant l'acide hydroxyméthylacrylique.

Comme l'indique le tableau n° 25 , le mélange constitué par les acides malique, succinique, citrique et hydroxyméthylacrylique

| NATURE DES MELANGES | % D'AUGMENTATION | DUREE D'ACTION |
|---|---|---|
| Acides malique, citrique et H.M.A.* (13,3 mg aa/kg) | 56 % | 10' |
| Acides malique, succinique et H.M.A.* (13,3 mg aa/kg) | 135 % | 21' |
| Acides malique, succinique citrique et H.M.A.* (10 mg aa/kg) | 246 % | 42'30" |
| Acides malique, citrique succinique, glycolique glycérique et H.M.A.* (6,6 mg aa/kg) | 107 % | 26'30" |

* H.M.A. : Acide hydroxyméthylacrylique

Tableau n°25 : Effets diurétiques sur le lapin de différentes associations d'acides renfermant l'acide hydroxyméthylacrylique.

(10 mg/kg aa), se révèle être le plus actif. Cette association méritant donc une étude plus approfondie, nous avons recherché son activité diurétique optimale en suivant les variations du flux urinaire consécutives à l'administration de doses croissantes de ce mélange. Le tableau n° 26 et la figure n°XXIX qui rendent compte des résultats obtenus, montrent que le mélange de ces quatre acides injectés à la dose de 10 mg/kg aa se révèle être un puissant diurétique. Pour des quantités supérieures (15 et 20 mg/kg aa), l'effet diurétique enregistré n'est que légèrement augmenté.

En conclusion, les diurèses forcées chez le lapin placé sous perfusion constante de soluté isotonique de chlorure de sodium, nous ont montré que si l'association des acides malique, citrique et succinique posséde déjà un effet diurétique net, son activité est nettement renforcée après addition d'acide hydroxyméthylacrylique, dont la présence semble déterminante.

Ainsi, le mélange qui possède de très loin l'activité la plus grande, est l'association réunissant ces quatre acides à la dose de 10 mg/kg aa. Ces résultats sont d'ailleurs en parfaite corrélation avec ceux obtenus lors de l'étude des propriétés amphocholérètiques des associations d'acides.

Si notre objectif premier était d'identifier les acides organiques ainsi que leurs associations déclenchant une augmentation de la diurèse chez le lapin, il est nécessaire maintenant d'examiner le retentissement possible de ces produits sur la composition ionique urinaire.

| DOSES ADMINISTREES EN mg/kg | % D'AUGMENTATION | DUREE D'ACTION |
|---|---|---|
| 2 | 26 | 11'45" |
| 5 | 70 | 13'45" |
| 7 | 135 | 22' |
| 10 | 246 | 42'30" |
| 15 | 260 | 44' |
| 20 | 260 | 42' |

Tableau n° 26 : Action diurétique de l'association quaternaire Acides malique - citrique - succinique et hydroxyméthylacrylique, selon la dose injectée.

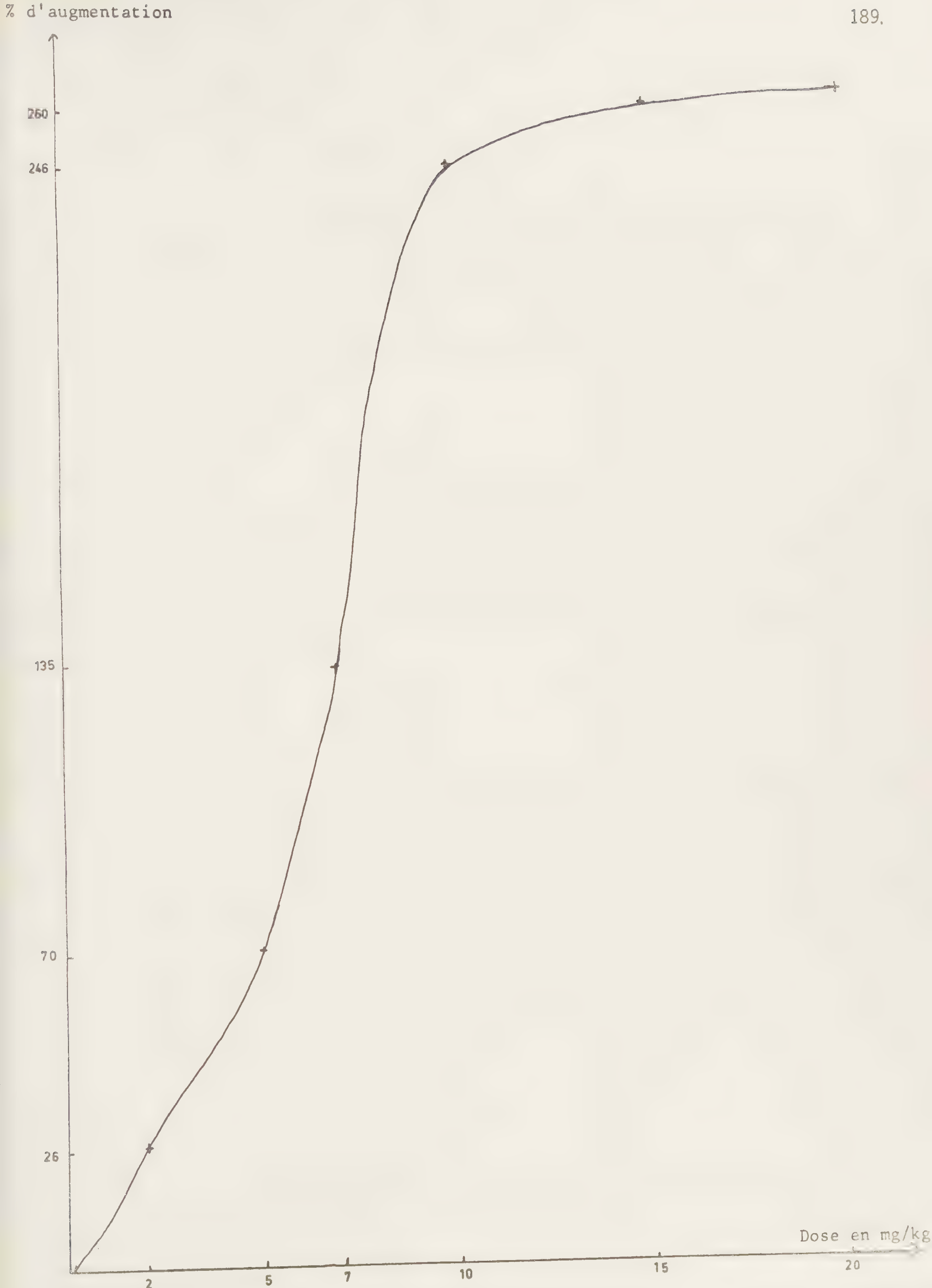



Figure n° XXIX : Courbe d'activité diurétique du mélange des acides malique, citrique, succinique et hydroxyméthylacrylique en fonction de la dose injectée.

b) Bilan ionique urinaire

Afin d'apprécier la qualité de la diurèse induite par les différents composés qui présentent une activité diurétique certaine, nous avons déterminé sur les différentes fractions urinaires recueillies au cours des expérimentations, les teneurs en ions sodium, potassium et chlorure.

(1) Protocole de dosage

Les dosages du sodium et du potassium ont été effectués par photométrie de flamme sur des dilutions d'urine au 1/500e dont on a préalablement noté le pH. Quant aux chlorures, ils ont été dosés par la méthode de VOTOCEK.

(2) Résultats

A la lecture du tableau n° 27 qui récapitule les résultats obtenus, on voit que dans le cas de l'acide hydroxyméthylacrylique, l'acide glycérique ainsi que du mélange des acides malique, succinique et hydroxyméthylacrylique, les teneurs en ions $Na^+$, $K^+$ et $Cl^-$ varient dans le même sens que les quantités d'urine émises. Des constatations identiques peuvent être faites après injection des autres mélanges d'acides actifs ou de l'extrait d'Artichaut.

(3) Conclusion

Aucun effet de discrimination ou de concentration particulière d'un ion, ni de diurèse aqueuse n'a été observé au cours des expériences

| Produits essayés | N° du prélèvement | pH | Temps de prélèvement | Augm. en % du débit urinaire | $Na^+$ | | $K^+$ | | $Cl^-$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | mg/mn | Augm. en % du débit de $Na^+$ | mg/mn | Augm. en % du débit de $K^+$ | mg/mn | Augm. en % du débit de $Cl^-$ |
| Ac. glycérique (40 mg/kg) | Témoin 1 | 5,8 | 6'50" | | 3,54 | | 0,35 | | 9 | |
| | Injection 2 | 6,2 | 3'45" | 82 % | 6,3 | 78 % | 0,62 | 72 % | 15,7 | 74 % |
| | 3 | 6,4 | 4'45" | 43 % | 5,05 | 43 % | 0,48 | 36 % | 12 | 33 % |
| | 4 | 6 | 5'45" | 19 % | 4,06 | 15 % | 0,40 | 12 % | 10 | 11 % |
| H.M.A. (40 mg/kg) | Témoin 1 | 5,8 | 5'35" | | 3,64 | | 0,32 | | 9,2 | |
| | Injection 2 | 6,1 | 4'15" | 31 % | 4,6 | 26 % | 0,41 | 28 % | 12,2 | 33 % |
| | 3 | 6,4 | 3'30" | 59 % | 5,65 | 55 % | 0,52 | 62 % | 14,3 | 56 % |
| | 4 | 6 | 4'12" | 33 % | 4,85 | 33 % | 0,43 | 34 % | 12,3 | 34 % |
| H.M.A. (10 mg/kg) Ac. succinique (10 mg/kg) Ac. malique (10 mg/kg) | Témoin 1 | 5,8 | 6'30" | | 3,65 | | 0,35 | | 8,5 | |
| | Injection 2 | 6,5 | 3'30" | 85 % | 6,77 | 85 % | 0,66 | 88 % | 16,6 | 95 % |
| | 3 | 7 | 2'40" | 144 % | 8,68 | 138 % | 0,95 | 165 % | 19,8 | 133 % |
| | 4 | 6 | 5'50" | 11 % | 4,15 | 14 % | 0,5 | 14 % | 9,4 | 10 % |

Tableau n° 27 : Bilan ionique urinaire, après injection des acides glycérique, hydroxyméthylacrylique et du mélange acide hydroxyméthylacrylique - acide succinique - acide malique.

précédentes ; au contraire de ce qu'il est fréquent de rencontrer avec les diurétiques mercuriels ou sulfamidés dont cet effet présente un danger en thérapeutique.

La discordance entre nos résultats et ceux rapportés par BALANSARD (1952) au sujet des chlorures peut facilement s'expliquer, car les effets observés dans notre cas sont à court terme alors que les éliminations importantes de chlorures cités par cet auteur ne surviennent que 48 heures après l'administration d'acides glycolique et glycérique dont notre mélange d'acides est pauvre.

4) Effet protecteur vis-à-vis de certains toxiques

Déjà signalé par TIXIER en 1939, le rôle détoxicant de l'Artichaut a pu être vérifié récemment par CRUZ-OTEO (1970) et par JONDET (1970) à la suite de l'administration à des animaux narcosés par le Penthothal d'un extrait purifié de *Cynara scolymus* (CHOPHYTOL). Cet extrait se révèle être actif sur la diminution de la durée de narcose induite par l'anesthésique.

Les expériences de CRUZ-OTEO réalisées sur 15 chiens répartis en 3 lots de 5 animaux ont été conduites de la façon suivante. Dans un premier temps, la durée de l'anesthésie est notée après injection par voie intraveineuse de pentobarbital à ces animaux. Ces derniers reçoivent 3 jours plus tard, une injection de Chophytol aux doses respectives de 1 $cm^3$/kg pour le premier lot, 2 $cm^3$/kg pour le deuxième lot et 3 $cm^3$/kg pour le troisième lot, puis 10 minutes après une injection de la même dose de pentobarbital. Dans ces conditions, on observe une diminution de moitié du temps d'anesthésie pour les animaux

du premier lot. Cette action s'atténue pour les deux autres lots d'animaux, malgré une dose de Chophytol plus importante (2 $cm^3$ et 3 $cm^3$/kg).

JONDET (1970) aboutit aux mêmes résultats en opérant sur la souris. La diminution maximale du temps de narcose est également enregistrée, après administration du Chophytol à la dose de 1 $cm^3$/kg, 20 minutes avant l'injection du barbiturique.

Les dérivés caféyl-quinique ainsi que les flavonoïdes ne peuvent être responsables de cette action détoxicante. En effet, comme nous l'avons déjà signalé, le mode de préparation de cet extrait purifié élimine tous les constituants polyphénoliques. Les acides organiques, et en particulier l'acide hydroxyméthylacrylique, pouvant donc en être le support, nous avons tenté de le vérifier tout d'abord vis-à-vis du pentobarbital, puis de l'alcool éthylique.

a) Rôle détoxicant vis-à-vis du pentobarbital

(1) Acide hydroxyméthylacrylique

Afin de mettre en évidence l'éventuelle action de l'acide hydroxyméthylacrylique vis-à-vis du pentobarbital, nous avons appliqué la technique décrite par JONDET.

α. Protocole opératoire

20 souris d'un poids moyen de 30 g ont été utilisées pour cet essai. Les animaux, répartis en 2 lots de 10 souris et placés dans une enceinte thermostatée à 28°C pendant le temps de la narcose, sont traités de la manière suivante :

☐ Groupe n° 1

Les animaux reçoivent en injection intra péritonéale 10 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique sous forme de sel de sodium. Après un délai de 20 minutes, on injecte par la même voie le pentobarbital (Nembutal ABBOTT) à raison de 30 mg/kg.

Le sommeil est considéré comme installé lorsque les souris acceptent la position de décubitus et la fin du temps de sommeil est comptée lorsque l'animal reprend son attitude normale, après trois tentatives de remise en position de décubitus.

☐ Groupe n° 2

Les animaux servant de témoins au groupe précédent, reçoivent 0,4 $cm^3$ de solution physiologique pour 20 g de souris avant l'injection de pentobarbital.

β. Résultats

La moyenne du temps de sommeil observé sur le groupe témoin est de 2495 secondes, alors que le temps de narcose pour le groupe n° 1 est de 977 secondes. L'acide hydroxyméthylacrylique provoquant une diminution importante du temps de narcose induite par le pentobarbital, nous avons repris l'expérimentation sur l'extrait butanolique d'Artichaut, puis sur le mélange artificiel des acides malique, succinique, citrique et hydroxyméthylacrylique.

(2) Extrait butanolique d'Artichaut

Le protocole expérimental est identique à celui décrit plus haut.

Les animaux répartis en deux lots de 10 souris reçoivent

Groupe n° 1

10 mg/kg d'extrait butanolique d'Artichaut, préalablement débarrassé de butanol, et salifié à l'aide d'une solution de carbonate de sodium à 10 %. Après un délai de 20 minutes, on injecte par la même voie le pentobarbital à raison de 30 mg/kg.

Groupe n° 2

0,4 $cm^3$ de solution physiologique pour 20 g de souris, puis 20 minutes après la même dose de pentobarbital.

Les résultats montrent qu'une diminution importante du temps de sommeil est à nouveau enregistrée. Le temps de narcose pour le groupe n° 1 est de 980 secondes, alors qu'il est de 2495 secondes pour le lot d'animaux témoins. L'extrait butanolique d'Artichaut à la dose de 10 mg/kg a donc un effet détoxicant analogue à celui enregistré avec 10 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique.

(3) Mélange artificiel des acides organiques

On injecte aux souris réparties en lots de 10 animaux

Groupe n° 1

Le mélange des acides succinique, citrique, malique et hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg pour chaque acide dans 0,4 $cm^3$ de solution aqueuse pour 20 g de souris.

Groupe n° 2

Le même mélange artificiel d'acides à la dose de 6,5 mg/kg

pour chaque acide.

Groupe n° 3

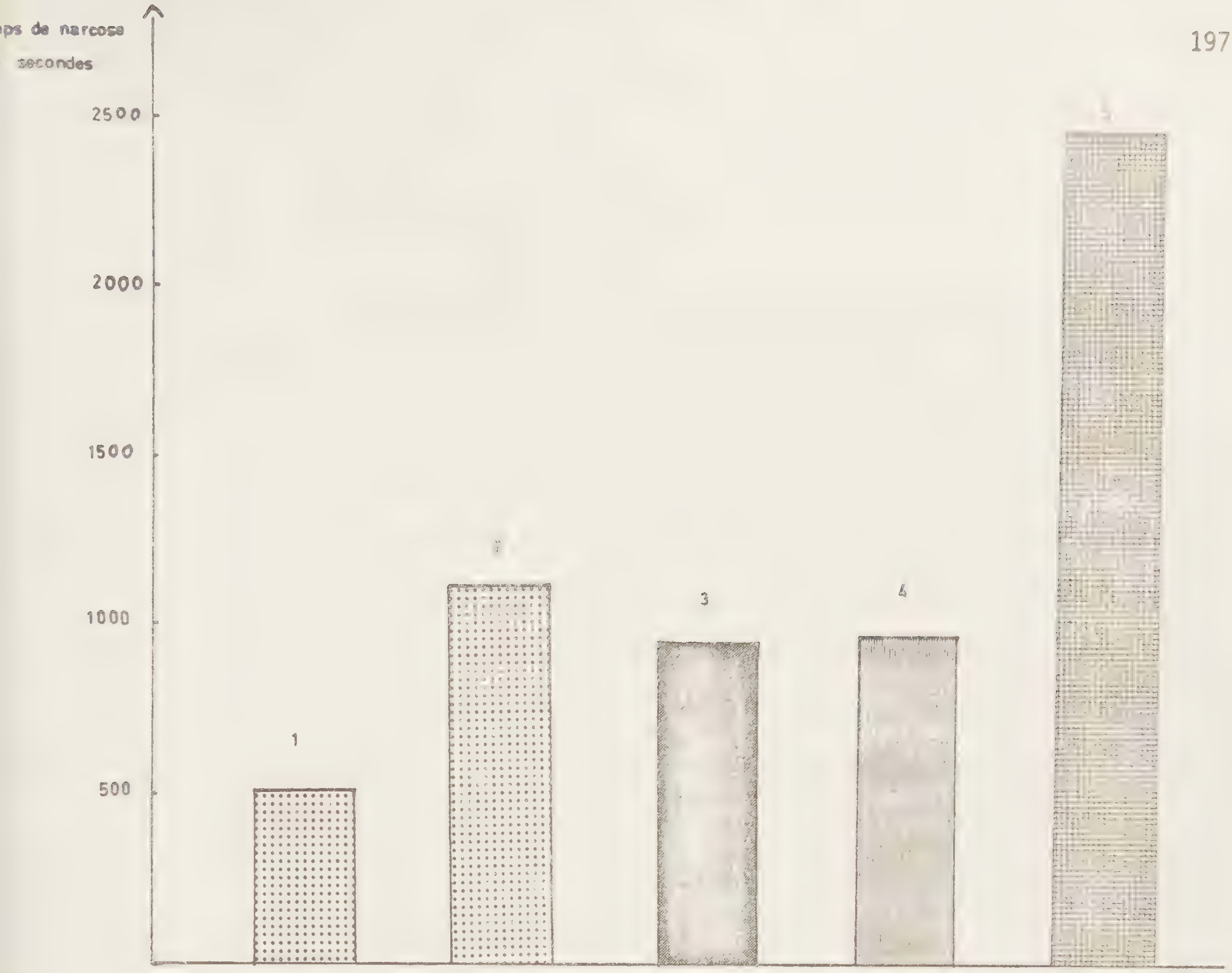
0,4 $cm^3$ de solution physiologique pour 20 g de souris avant l'injection de pentobarbital.

La moyenne de la durée de sommeil observée sur le groupe témoin étant toujours de 2495 secondes, le temps de narcose pour les groupes n° 1 et 2 sont respectivement de 517 secondes et de 1120 secondes. L'ensemble des résultats ainsi obtenus sont rassemblés dans la figure n° XXX . Nous donnons également à titre indicatif, les valeurs statistiques des résultats obtenus pour le groupe n° 1 dans le tableau ci-dessous.

Durée de la narcose en secondes

| | Groupe n° 1<br>Témoin | | Groupe n° 1<br>Injection du mélange acide |
|---|---|---|---|
| | 1272 | | 870 |
| | 2100 | | 545 |
| | 2640 | | 255 |
| | 3480 | | 780 |
| | 3600 | | 360 |
| | 1140 | | 420 |
| | 3120 | | 480 |
| | 3460 | | 640 |
| | I980 | | 540 |
| | 2160 | | 280 |
| Moyenne : | 2495 | Moyenne : | 517 |
| Variance : | 822150 | Variance : | 41162,2 |
| Ecart type | 906,7 | Ecart type : | 212,8 |

Quotient du test : 6,73




1 Mélange artificiel des acides à la dose de 2,5 mg/kg

2 Mélange artificiel des acides à la dose de 6,5 mg/kg

3 Acide hydroxyméthylacrylique

4 Extrait butanolique d'Artichaut à la dose de 10 mg/kg

5 Témoin

Figure n°XXX : Variations du temps de narcose induite par le pentobarbital chez la souris à la suite d'injections d'acide hydroxyméthylacrylique seul ou en mélange avec les acides citrique, succinique, malique comparativement à l'injection d'extrait butanolique d'Artichaut.

④ Discussion

Cette série d'observations nous permet de constater une diminution importante du temps de narcose induite par le pentobarbital à la suite de l'injection de l'acide hydroxyméthylacrylique ou du mélange naturel ou artificiel des acides organiques. Cependant, la diminution du temps de narcose la plus importante enregistrée est celle dûe au mélange des acides succinique, malique, citrique et hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg pour chacun des acides organiques.

On constate également le phénomène déjà observé par CRUZ-OTEO et JONDET : l'action s'atténue lorsque les animaux reçoivent des doses plus importantes d'acides. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer la moindre activité de l'extrait d'Artichaut dont les proportions en acides organiques sont très différentes.

Il faut également signaler des variations importantes du temps de latence précédant le sommeil. En effet, la moyenne du temps de latence chez les animaux témoins est de 896 secondes, alors que cette moyenne n'est plus que de 672 secondes pour le groupe d'animaux protégés par le mélange des acides à la dose de 2,5 mg/kg aa et de 350 secondes chez les animaux traités par 10 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique. Le sommeil s'installe donc plus rapidement chez les animaux traités par l'acide hydroxyméthylacrylique ou par le mélange des acides précités, mais par contre la narcose semble moins profonde.

b) Rôle protecteur vis-à-vis de l'alcool éthylique

Afin de vérifier le rôle protecteur éventuel des acides organiques et en particulier de l'acide hydroxyméthylacrylique, vis-à-vis

de l'alcool éthylique, nous avons déterminé tout d'abord la DL 50 de l'alcool éthylique sur des souris, puis les variations de cette dernière sous l'influence du dérivé acrylique puis du mélange naturel ou artificiel des acides organiques.

### (1) Détermination de la DL 50 de l'alcool éthylique

#### α. Mode opératoire

La DL 50 de l'alcool éthylique est déterminée par la méthode de REED et HUENCH, dite des totaux cumulatifs. Pour cela, 60 souris mâles d'un poids moyen de 20 g réparties en des lots de 10 animaux, reçoivent par voie intrapéritonéale, des quantités croissantes d'alcool à raison de 0,5 $cm^3$ pour 20 g de souris. Lorsque la mort n'est pas survenue dans les 48 heures qui suivent l'administration du produit, la survie des animaux surveillés pendant 8 jours a été de règle.

#### β. Résultats

Consignés dans le tableau ci-dessous, ils permettent de fixer la DL 50 de l'éthanol à 5,6 g/Kg.

| Dose d'alcool absolu administrée en g/kg | Vivants | Vivants cumulés | Morts | Morts cumulés |
|---|---|---|---|---|
| 4,8 | 10 | 27 | 0 | 0 |
| 5,2 | 8 | 17 | 2 | 2 |
| 5,6 | 5 | 9 | 5 | 7 |
| 6 | 3 | 4 | 7 | 14 |
| 6,4 | 1 | 1 | 9 | 23 |
| 6,8 | 0 | 0 | 10 | 30 |

Détermination de la DL 50 de l'alcool éthylique selon REED et HUENCH (totaux cumulatifs)

(2) Modification de la DL 50 de l'alcool éthylique sous l'influence de divers acides

α. Acide hydroxyméthylacrylique

Comme précédemment la DL 50 est établie sur 5 lots de 10 souris ayant reçu 20 minutes avant l'injection de doses croissantes d'alcool éthylique, 10 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique.

Comme le montre la figure n° XXXI, la DL 50 de l'alcool éthylique est nettement augmentée, puisqu'elle passe de 5,6 g/kg à 7 g/kg.

β. Extrait butanolique d'Artichaut

Les animaux reçoivent avant l'injection de doses croissantes d'alcool éthylique, 10 mg/kg d'extrait butanolique d'Artichaut préalablement privé de butanol, puis salifié par une solution de carbonate de sodium à 10 %.

Représentés graphiquement sur la figure n° XXXI, les résultats obtenus permettent de fixer la nouvelle DL 50 de l'alcool éthylique à 6,8 g/kg d'animal.

γ. Mélange artificiel des acides organiques

La protection des animaux vis-à-vis de l'alcool éthylique est assurée par l'injection préalable du mélange des acides succinique, malique, citrique et hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg pour chacun de ceux-ci.

Dans ces conditions, la DL 50 de l'alcool éthylique, égale à 7,1 g/kg, est très voisine de celle obtenue après injection de 10 mg/kg d'acide hydroxyméthylacrylique.

○ D L 50 de l'alcool éthylique

△ D L 50 de l'alcool éthylique avec protection par l'acide hydroxyméthylacrylique

□ D L 50 de l'alcool éthylique avec protection par le mélange des acides malique, succinique, citrique et hydroxyméthylacrylique

Figure n° XXXI : Variations de la D L 50 de l'alcool éthylique à la suite de l'injection chez la souris d'acide hydroxyméthylacrylique seul ou en mélange avec les acides citrique, malique et succinique.

### (3) Discussion

L'acide hydroxyméthylacrylique ou le mélange artificiel ou naturel des acides organiques semblent donc posséder une action protectrice assez importante vis-à-vis de l'alcool éthylique.

Nos expérimentations nous ont montré en outre, que la protection maximale des animaux est obtenue avec le mélange quaternaire : acides succinique, malique, citrique et hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg pour chacun de ceux-ci.

D'autre part, les observations déjà constatées pour le pentobarbital sont confirmées : plus les quantités d'acides organiques injectées augmentent, plus l'effet protecteur diminue.

On voit donc combien est importante la question des doses et proportions respectives des acides en mélange, les effets détoxicants optimum ne se manifestant que pour des doses inscrites dans une étroite fourchette en dehors de laquelle, les effets s'atténuent.

## CHAPITRE III : HYPOTHESES CONCERNANT LES RAPPORTS ENTRE LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES ET LES METABOLISMES CELLULAIRES

Tout ce qui précède nous permet de rattacher certaines activités de l'Artichaut à l'existence de quelques acides organiques présents dans ce que nous avons appelé son "bloc acide".

En plus des acides relativement courants : acides lactique, citrique, fumarique, succinique, malique, voire glycolique et glycérique, il faut signaler la présence d'un acide plus particulier : l'acide hydroxyméthylacrylique. L'association des acides citrique, malique, succinique et hydroxyméthylacrylique est indispensable pour que les principales activités pharmacologiques se manifestent pleinement. Celles-ci peuvent se résumer comme suit :

- une action amphocholérétique nette ;
- une action diurétique importante, ne se signalant pas par une clearance particulière ou une discrimination de certains ions ;
- une action favorisant l'estérification du cholestérol dans la bile (MORTIER, 1972) ;
- une action protectrice contre l'intoxication par le pentobarbital et l'alcool éthylique ;
- une action bactériostatique surtout nette vis-à-vis du streptocoque et une action antifongique vis-à-vis des levures *Cryptococcus neoformans* et *Rhodotorula sp.*.

Outre ces activités mises en évidence sur des êtres vivants, on note, au niveau cellulaire, une inhibition de la succinyl-déshydrogénase dûe à l'acide hydroxyméthylacrylique.

Quelles corrélations pouvons-nous faire entre ces divers phénomènes ?

☐ Une première constatation s'impose, quant aux effets sur le métabolisme cellulaire : c'est l'inhibition de la succinyl-déshydrogénase, d'où accumulation d'acide succinique dans le cycle de Krebs.

On peut peut-être rattacher à cette inhibition les propriétés pharmacologiques suivantes :

- Le raccourcissement du temps de narcose par le pentobarbital :

En effet, le ralentissement du cycle de Krebs dû à l'inhibition d'une de ses enzymes fondamentales entraîne une réduction du métabolisme, d'où une diminution de la consommation d'oxygène cellulaire. On peut concevoir dans ces conditions, une action plus rapide du toxique dont la destruction métabolique serait ralentie.

- La diminution du temps de narcose induite par le pentobarbita

Bien qu'il soit très difficile de se faire une opinion sur les conséquences de l'accumulation très importante d'acide succinique dans la cellule, dûe au blocage de son enzyme de dégradation, il semble que l'on puisse rattacher la diminution du temps de narcose induite par le pentobarbital à la présence de cet acide.

En effet, l'acide succinique est connu pour lutter, à hautes doses, efficacement contre le pentobarbital au niveau du tissu nerveux*. Cette possibilité semble d'ailleurs renforcée ici par le fait que l'association à l'acide hydroxyméthylacrylique de plusieurs acides du cycle de Krebs (acides malique, succinique et citrique) qui conduisent tous à l'acide succinique comme le montre la figure n°XXXII, raccourcit de façon significative la durée du temps de narcose induite par cet anesthésique.

---

* J.M. JOUANY : communication personnelle.

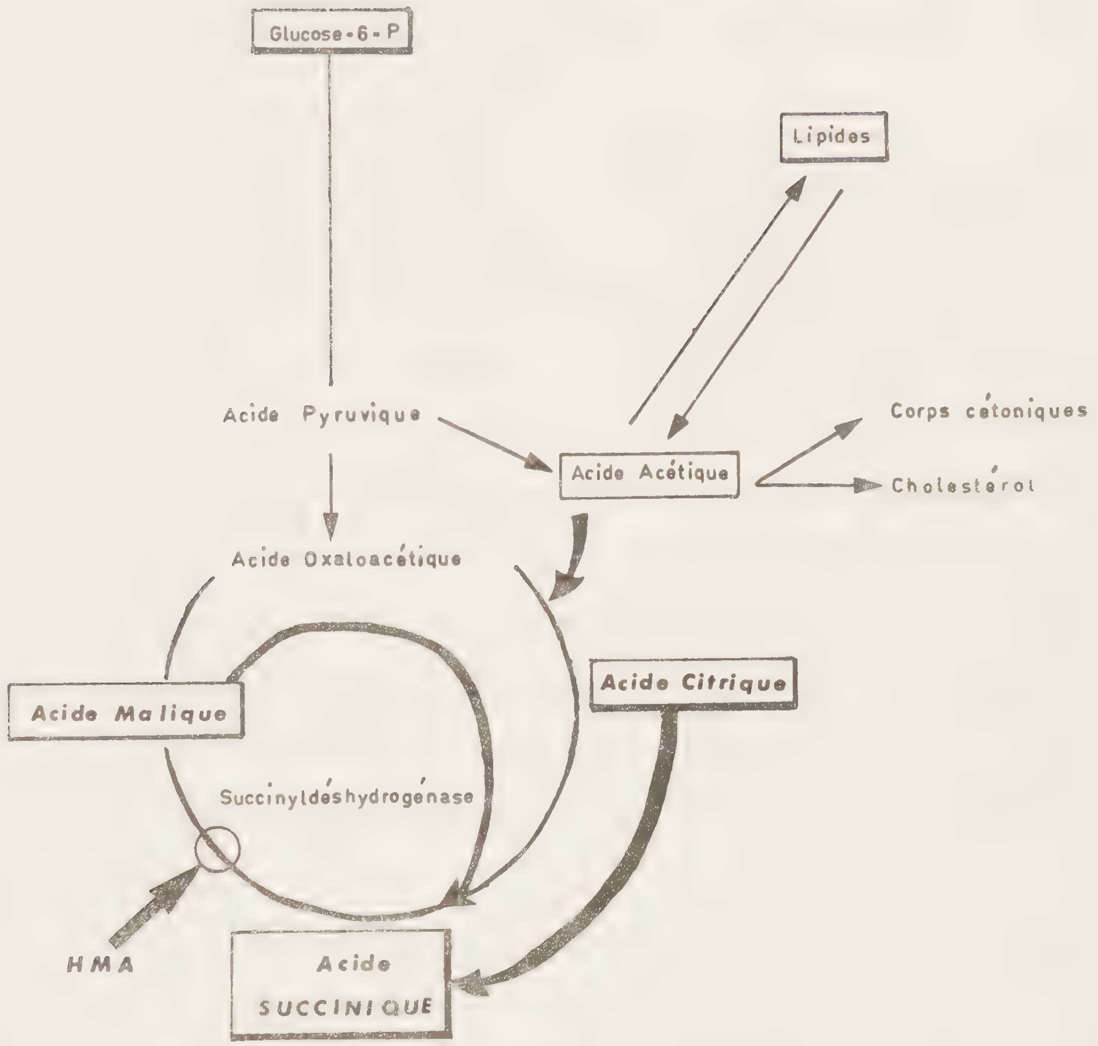



Figure n° XXXII : Schéma mettant en évidence les relations métaboliques des acides organiques dans le cycle de Krebs, ainsi que l'impact de l'acide hydroxyméthylacrylique au niveau de ce cycle.

❑ S'il est ainsi possible d'expliquer l'action détoxicante de l'Artichaut vis-à-vis du pentobarbital, nous ne disposons que de peu d'éléments permettant d'interpréter l'action bénéfique de la plante au niveau du métabolisme lipidique.

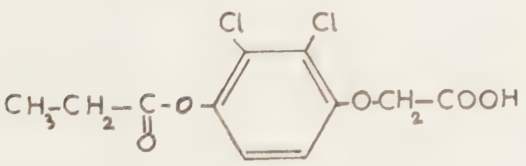
Un rapprochement peut être toutefois fait dans ce cas entre l'acide hydroxyméthylacrylique et l'acide malonique, ce dernier bloquant également la succinyl-déshydrogénase. Or l'acide malonique est le premier corps formé au cours de la synthèse lipidique à partir de l'acétyl-coenzyme A. Dès lors que les deux acides se comportent de la même manière à l'égard de la succinyl-déshydrogénase, il n'est pas interdit de poser comme hypothèse qu'ils puissent être également compétitifs entre eux, au niveau de la synthèse lipidique. Dans ces conditions, l'acide hydroxyméthylacrylique se substituant à l'acide malonique bloquerait le déroulement normal de la synthèse des acides gras, et par conséquent expliquerait l'action hypolipidémique de l'Artichaut décrite à plusieurs reprises.

Il semble d'ailleurs possible d'envisager un mécanisme analogue pour expliquer l'action hépato-protectrice de l'acide démécrotique récemment introduit en thérapeutique par les laboratoires BIOCODEX sous le nom d'HEPADIAL. En effet, par sa structure cet acide rappelle l'acide crotonique dont l'intervention dans la synthèse lipidique est bien connue de nos jours. Il empêcherait donc le déroulement normal de la synthèse lipidique, non plus à partir du malonyl-coenzyme A, mais à partir du crotonyl-coenzyme A, dont il serait également compétiteur. Si ces deux hypothèses, qui se renforcent mutuellement, étaient exactes, on pourrait dire que l'acide hydroxyméthylacrylique bloque la synthèse lipidique par compétition de la molécule en $C_4$ (acide malonique), tandis

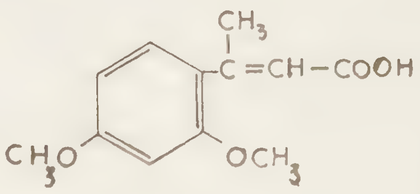
que l'acide dimécrotique la bloque au stade suivant de la molécule en $C_6$ (acide crotonique).

D'un autre côté, l'acide malique présent en grande quantité dans les extraits d'Artichaut, en augmentant dans le cycle de Krebs la production d'oxaloacétate, qui piège l'acétyl-coenzyme A pour le réintroduire dans le cycle sous forme de citrate, empêche peut-être l'accumulation d'acétyl-coenzyme A qui, lorsqu'il est en excès, est un générateur du cholestérol et des corps cétoniques. Ceci contribuerait peut-être à expliquer les vertus hypocholestérolémiantes de l'Artichaut qui se manifestent chez l'animal en hypercholestérolémie.

☐ Quant à l'action hépato-diurétique de l'acide hydroxyméthylacrylique, elle peut peut-être se rattacher à la potentialité pharmacologique des dérivés acryliques. Nous nous contenterons de citer dans cette optique, l'acide éthacrynique qui est l'un des diurétiques les plus puissants que l'on connaisse et l'acide dimécrotique introduit en thérapeutique comme hépatoprotecteur.



Acide éthacrynique



Acide dimécrotique

☐ Notons enfin, l'augmentation notable des phénomènes d'estérification du cholestérol (MORTIER, 1972), de destruction de la folliculine par le foie* et d'antagonisme vis-à-vis de l'éthanol.

* JONDET : Communication personnelle.

Doit-on alors parler d'action antagonisme d'origine microsomale par <u>induction enzymatique</u> ? Cela concorderait évidemment avec une destruction accrue du pentobarbital par le foie, ce qui permettrait ainsi de donner une nouvelle explication à l'effet antagoniste du mélange des acides organiques de l'Artichaut vis-à-vis de cet anesthésique.

Dans ces conditions, la rapidité de l'apparition de la narcose serait dûe, comme nous l'avons dit, à la diminution de la consommation d'oxygène des tissus par inhibition de la succinyl-déshydrogénase. Puis, dans une seconde étape, la diminution du temps de narcose pourrait être attribuée à la fois à une production enzymatique au niveau du foie accélérant la destruction de l'anesthésique et à une accumulation d'acide succinique dont on sait les effets antagonistes vis-à-vis de ce barbiturique.

Des explications complémentaires, que nous nous proposons de mettre en oeuvre prochainement, nous permettrons peut-être d'infirmer ou de confirmer l'une ou l'autre de ces supputations biochimiques qui ne sont pour l'instant que pures hypothèses.

# CONCLUSIONS GENERALES

L'Artichaut (*Cynara scolymus* L., Composées) reste encore très employé en thérapeutique pour ses propriétés hépatorénales. En faisant l'inventaire des connaissances sur ses principes actifs, les directions de recherche s'étaient surtout orientées, soit vers les dérivés caféyl-quinique dont le principal représentant est la cynarine isolée de la plante par PANIZZI et SCARPATI (1954), soit vers les polyphénols dérivant du lutéol tels que le cynaroside, le scolymoside et le cynarotioside (MICHAUD et MASQUELIER, 1956). Ces divers composés étaient, dans une certaine mesure, capables de favoriser chez l'animal, la cholérèse et la diurèse.

Toutefois, un certain nombre d'indices nous amenaient à penser que ces molécules ne devaient pas être les seules responsables des activités précitées. En effet, certaines préparations galéniques ne contenant plus, ni cynarine, ni flavonoïdes, conservaient malgré tout une activité hépatorénale non négligeable*.

D'autres composés, connus ou inconnus, présents dans le végétal et conservés dans ces extraits galéniques, susceptibles d'être le support des activités thérapeutiques hépatorénales de ces derniers devainet donc être recherchés. C'est le but auquel nous nous sommes attachés.

Il faut toutefois signaler, qu'en entreprenant ce travail, nous ne nous engagions pas dans un terrain totalement inexploré, puisque les travaux de BALANSARD (1952), nous avaient déjà montré que de petites molécules telles que les acides glycérique et glycolique pouvaient participer à l'activité diurétique d'un certain nombre d'espèces végétales traditionnellement utilisées à cette effet en médecine populaire.

---

* C'est le cas par exemple d'un extrait spécialisé par les laboratoires Rosa-Phytopharma sous le nom de CHOPHYTOL.

Il nous a semblé intéressant de débuter notre travail par l'étude du principe amer de l'Artichaut décrit sous le nom de cynaropicrine par SUCHY, SORM et HEROUT (1960), cette molécule n'ayant fait, à notre connaissance, l'objet de recherche que sur le plan strictement chimique.

Etude de la cynaropicrine

Nous avons donc isolé le principe amer à partir des feuilles sèches, selon les techniques déjà proposées et nous en avons vérifié l'identité avant d'entreprendre les essais pharmocologiques sur l'animal. Dans ce but, il fallait fixer son choix sur des tests pharmacologiques se rapportant aux indications thérapeutiques et cliniques de la plante.

Ainsi, l'éventuelle activité hépatique du guaïanolide a été testée en appréciant chez le rat, ses actions cholérètiques et amphocholérètiques (antagonisme vis-à-vis des effets hypercholérètiques du Dycholium et des effets hypocholérètiques de l'azoture de sodium selon BOUCARD). Quant à l'action vis-à-vis du rein, elle a été appréciée en étudiant l'action diurétique de cette molécule sur le lapin placé en surcharge hydrique. Dans ces conditions, la cynaropicrine nous est apparue dénuée de toute activité hépatique et rénale, ce qui semble bien prendre en défaut la théorie des signatures, attribuant aux substances amères des effets favorables sur le fonctionnement hépatique.

Toutefois, la molécule de cynaropicrine contient un motif acrylique : l'acide hydroxyméthylacrylique, lequel est fixé sur le reste guaïanolide. Or il se trouve que ce radical acrylique rappelle, par sa structure, la chaîne latérale d'une substance de synthèse : l'acide éthacrynique*, dont l'effet diurétique est

* spécialisé sous le nom d'EDECRINE par les laboratoires MERCK-SCHARP et DO

est notoire. Cette analogie de structure nous a conduit à rechercher les actions pharmacologiques de l'acide hydroxyméthylacrylique dont les effets diurétique et cholérètique pourraient se manifester, soit lorsqu'il est séparé du noyau guaïanolide de la cynaropicrine, soit lorsqu'il est présent à l'état libre dans la plante.

Etude de l'acide hydroxyméthylacrylique

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement physico-chimique de cet acide, obtenu par synthèse. Cela nous a conduit à définir ses conditions d'isolement à partir des extraits végétaux et ses moyens de caractérisation et de dosage. C'est ainsi que l'acide hydroxyméthylacrylique peut être extrait d'une liqueur aqueuse acidifiée à pH 1,5 par le mélange (n)-butanol-acétate d'éthyle (1-1, V/V). Ce procédé sera donc retenu pour l'extraire des milieux complexes auxquels nous avons affaire. Il réagit avec les réactifs généraux des acides alcools (réactifs de BERG et d'UFFELMANN) et peut fixer le mercure sur sa double liaison.

Il est décelable par chromatographie en couche mince, soit par migration dans un solvant acide (toluène, formiate d'éthyle, acide formique (5-4-1, V/V) et révélation par une série de réactifs généraux (Phosphomolybdique, SCHWEPPE), puis particuliers (Acide chromotropique, p-nitraniline diazotée), soit par migration dans des solvants alcalins du type : éthanol-chloroforme-ammoniaque à 25 % (68-15-17, V/V) et révélation par le dichlorophéno l indophénol. On peut encore faire migrer son dérivé d'addition mercuriel que l'on révèle par la diphénylcarbazide.

Il peut être mis en évidence par chromatographie en phase vapeur sous forme de dérivé triméthylsilylé ou de dérivé méthylé. Dans ce dernier cas, la méthode d'estérification la plus favorable utilise le diazométhane. Si la formation des dérivés triméthylsilylés et méthylés peut être indifféremment utilisée pour l'analyse qualitative de l'acide hydroxyméthylacrylique, le dosage de ce dérivé ne peut être fait avec sécurité que sous forme de dérivé méthylé préparé par action du diazométhane, les conditions d'analyse quantitative étant identiques à celles décrites ci-dessus. Il est alors possible de détecter jusqu'à 3 ug du composé.

## Dosage de la cynaropicrine

Il paraissait dès lors possible de doser la cynaropicrine par l'intermédiaire de sa chaîne latérale hydroxyméthylacrylique ; mais pour cela, il est nécessaire de libérer l'acide hydroxyméthylacrylique. Cette opération est théoriquement réalisable en milieu acide ou alcalin, puisque la liaison entre les deux parties du principe amer de l'Artichaut est du type ester. Il était toutefois nécessaire de préciser les conditions optimales permettant d'hydrolyser la totalité de la cynaropicrine sans altérer l'acide hydroxyméthylacrylique ainsi libéré. Les méthodes d'hydrolyse conduites en milieu acide sulfurique 0,5 N ou en milieu alcalin, soude N, et que nous avons appelé "ménagées" permirent de satisfaire à ces exigences.

Dans ces conditions, après dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique par chromatographie en phase vapeur, nous avons retrouvé en moyenne 1 ‰ de cynaropicrine dans les 5 échantillons d'extrait d'Artichaut étu-

diés, ce qui correspond à une teneur d'acide hydroxyméthylacrylique de 31,5 mg pour 100 g de plante. On note que les résultats obtenus par les deux méthodes d'hydrolyse de la cynaropicrine sont comparables.

Mise en évidence de la présence d'acide hydroxyméthylacrylique à l'état libre

Si, jusqu'à présent nous nous sommes attachés à caractériser, puis à doser l'acide hydroxyméthylacrylique présentsous forme combinée dans la cynaropicrine, l'on pouvait se demander si cette molécule n'existait pas également à l'état libre ou sous d'autres formes dans la plante.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché parmi les méthodes d'extraction applicables aux acides organiques, celle qui s'adapterait le mieux à notre cas particulier.

Ainsi, après extraction par l'eau neutre ou par le méthanol légèrement acide, les quelques ug d'acide hydroxyméthylacrylique retrouvés par chromatographie en phase vapeur, et qui ne proviennent pas de la cynaropicrine, permettent d'affirmer que cette molécule existe bien en très faible quantité à l'état libre dans la plante.

Toutefois, les teneurs très faibles trouvées pour l'acide hydroxyméthylacrylique ainsi que pour les autres acides organiques extraits simultanément de la plante par les solvants précédents, nous amenaient à rechercher d'autres techniques d'isolement visant à une extraction complète de ces acides ; les extractions furent donc effectuées après hydrolyse acide (acide sulfurique,0,5N) et alcaline (soude N) de feuilles sèches d'Artichaut. Il est alors frappant de constater que ces méthodes d'hydrolyses acide et alcaline, inhabituelles en phytochimie, permettent d'extraire les divers acides présents dans les extraits d'Artichaut avec un rendement bien supérieur à celui obtenu par les méthodes précédentes.

Malheureusement, ces méthodes hydrolysent totalement la cynaropicrine, qui libère ainsi sa fraction hydroxyméthylacrylique, ce qui ne permet plus d'envisager le dosage direct de cet acide présent à l'état libre dans la plante. C'est pour ces raisons que les teneurs en acide hydroxyméthylacrylique libre (ou sous forme de combinaison autre que la cynaropicrine) n'ont pu être établies qu'en effectuant la différence entre la teneur en acide hydroxyméthylacrylique total extrait par ces méthodes agressives et la teneur en acide hydroxyméthylacrylique combiné sous forme de cynaropicrine.

Ainsi, les teneurs en acide hydroxyméthylacrylique libre (ou engagé dans des combinaisons mal définies) sont en moyenne de 46 mg pour 100 g de feuilles, ce qui représente une quantité non négligeable lorsqu'on se souvient que 31,5 mg seulement sont combinés sous forme de cynaropicrine. Signalons que ces teneurs semblent varier au cours de la saison, problème que nous pensons approfondir ultérieurement.

Les conditions de libération et d'extraction de l'acide hydroxyméthylacrylique nous ont montré que cet acide est accompagné d'un certain nombre d'acides organiques qu'il restait à identifier.

Les autres acides organiques de l'Artichaut

Certaines réactions colorées traditionnelles des acides et acides alcools, le plus souvent empruntées à DENIGES, nous fournirent certaines indications sur la nature chimique de ces composés. Cependant, les premières caractérisations précises nous furent fournies par la chromatographie en couche mince, faisant appel aux différents types de solvants déjà utilisés pour l'identification de l'acide hydroxyméthylacrylique.

Après avoir adapté à la révélation sur plaque de Kieselgel G, une série de réactions préalablement expérimentées sur des acides témoins, nous avons pu établir une sorte de grille d'identification à double entrée, suivant le type de solvant ou le type de révélation.

Ceci nous permettait d'identifier les composés présents dans les blocs acides obtenus après extraction du matériel végétal par les différentes méthodes décrites précédemment : y furent reconnus les acides citrique, fumarique,glycolique, glycérique, lactique, malique et succinique.

Enfin, par l'emploi de conditions particulières de chromatographie en phase vapeur, nous apportant une confirmation supplémentaire de l'identité de ces acides organiques, il nous a été possible de doser les acides lactique, malique, fumarique et succinique.

Pour cela, la méthode d'estérification, à l'inverse de celle proposée pour le dosage de l'acide hydroxyméthylacrylique, nécessite l'emploi du méthanol trifluorure de bore. En effet, ce réactif d'estérification ne transforme pas, comme le fait le diazométhane, l'acide fumarique en dérivé de la pyrazolone, qui dans les conditions opératoires indispensables pour séparer avec un étalement correct les pics, ne sort plus par chromatographie en phase vapeur.

Les résultats quantitatifs obtenus ont montré que la méthode d'hydrolyse sulfurique 0,5 N permettait d'extraire les acides et acides alcools avec le meilleur rendement : l'acide malique est de très loin dominant (800 mg %), suivi des acides succinique (324 mg%), lactique (50 mg %) et fumarique (20,8 mg %).

L'acide citrique, n'ayant pu être dosé par cette méthode, nous

avons fait appel aux réactions enzymatiques, pour son dosage. Etendues au dosage des acides lactique et malique, ces méthodes enzymatiques nous ont permis en outre de vérifier la validité de la chromatographie en phase vapeur pour le dosage de ces deux acides : en effet, pour l'échantillon ci-dessus, on trouve 812 mg % d'acide malique et 40,2 mg % d'acide lactique, corrélation qui nous a paru satisfaisante.

Toutefois, contrairement à ce que l'on pouvait penser, les méthodes enzymatiques ne sont pas dénuées de toute critique, bien qu'elles devaient avoir a priori toute notre confiance pour leur spécificité et leur précision.

Déjà rendus difficiles par le fait que bon nombre d'enzymes ne sont pas commercialisés , il semble exister dans le matériel végétal des composés parasites inhibiteurs de certains enzymes, rendant certains dosages impossibles. L'exemple nous en est fourni par l'acide hydroxyméthylacrylique qui inhibe la succinyl-déshydrogénase, rendant ainsi le dosage de l'acide succinique impossible.

Il semble donc souhaitable, dans une démarche dichotomique, de commencer l'exploration d'un bloc acide végétal par la chromatographie en couche mince, puis par la chromatographie en phase vapeur selon les différentes conditions opératoires que nous avons proposées, et enfin de confirmer des points particuliers, quand cela est possible, par une détermination enzymatique. C'est de la confrontation de ces différents résultats que l'on peut se faire une idée relativement réaliste des proportions des divers constituants acides organiques dans les plantes.

Ces problèmes analytiques, une fois résolus, il fallait savoir si les acides organiques ainsi identifiés et dosés pouvaient être le support d'activités connues. Cette étude fit l'objet de la troisième partie de notre travail.

Relations entre la présence des divers composés acides et les activités pharmacologiques connues

Nous avons déjà vu que la cynarine et certains polyphénols pouvaient, dans une certaine mesure, être rendus responsables d'une partie des activités hépatorénales de la plante. Nous avons donc focalisé nos recherches sur ces deux plans, en utilisant des techniques permettant de mettre en évidence soit des actions cholérètique ou amphocholérètique (selon BOUCARD) témoins d'une action hépatique, soit une action diurétique chez l'animal en surcharge hydrique.

Comme nous l'avons déjà signalé la cynaropicrine sur laquelle nous avions fondé nos espoirs s'étant révélée inactive sur les tests précités, nous avons reporté nos efforts sur ses composants et en particulier sur sa chaîne latérale l'acide hydroxyméthylacrylique, qui pouvait se rattacher par sa structure à des drogues connues pour leurs propriétés hépatiques (acide démécrotique) ou rénale (acide éthacrynique). La mise en évidence de quantités notables d'acide hydroxyméthylacrylique à l'état libre nous incitait d'ailleurs à poursuivre les travaux dans ce sens. Nous avons pu ainsi lui reconnaître les activités suivantes :

- une action cholérètique discrète, mais dont les effets se prolongent dans le temps.

- une action antagoniste des effets hypocholérètiques de l'azoture de sodium (mais pas d'action vis-à-vis des effets hypercholérètiques du déhydrocholate de sodium). En fait, on ne peut donc lui attribuer un effet "amphocholérètique" dans le sens où BOUCARD a défini ce terme.

- une augmentation de la diurèse chez l'animal placé en surcharge hydrique, mais qui perturbe assez peu la concentration ionique de

de l'urine émise, ce qui nous permet de qualifier cette activité de "diurèse physiologique". Il n'y a pas, en effet, de discrimination ou de concentration particulière d'un ion, ni de diurèse aqueuse comme il est fréquent de le rencontrer avec les diurétiques mercuriels ou sulfamidés, ce qui est un inconvénient connu de leur emploi.

- une action antagoniste vis-à-vis du pentobarbital et de l'alcool éthylique, en raccourcissant le temps de narcose du premier et en augmentant la DL 50 du second. Ces actions paraissent toutefois diphasiques selon la dose utilisée.

L'acide hydroxyméthylacrylique est d'autre part un inhibiteur puissant de la succinyl-déshydrogénase, in vitro, ce qui d'ailleurs induit une réduction de la consommation d'oxygène par les tissus.

Il présente également une action anti-bactérienne, surtout notable vis-à-vis du streptocoque et un effet inhibiteur du développement de quelques levures.

Comme il se trouve, dans le bloc acide de la plante, associé à d'autres acides organiques, il nous a été possible de montrer que les actions décrites précédemment, et en particulier les actions hépatiques et diurétiques, sont fortement augmentées par la présence de trois autres acides : les acides citrique, malique et succinique.

C'est ainsi que l'association quaternaire : acide citrique, acide malique, acide succinique, acide hydroxyméthylacrylique possède la meilleure activité.

Ce dernier mélange présente cette fois une action amphocholérétique indiscutable, dont l'influence se fait également sentir sur la qualité de la bile : en effet, on constate une tendance extrêmement nette à l'augmentation du cholestérol estérifié, ce qui correspond effectivement

au point d'impact des différentes préparations d'Artichaut, fait signalé depuis longtemps dans la littérature.

Les diurèses forcées chez le lapin placé sous perfusion constante de soluté isotonique de chlorure de sodium, montrent également que cette même association présente une activité diurétique de très loin la plus importante, lorsqu'on la compare soit à celle d'autres mélanges, et en particulier du mélange acides succinique-citrique et malique, soit à celle de l'acide hydroxyméthylacrylique pris isolément.

A la suite des résultats obtenus par JONDET, sur la qualité de la narcose induite par le pentobarbital chez la souris ayant reçu l'extrait purifié de *Cynara scolymus*, nous avons comparé les effets produits par l'ex bloc acide extrait après hydrolyse acide de feuilles d'Artichaut, à ceux induits par le mélange quaternaire.

Nous avons pu ainsi constater des diminutions très nettes de la durée de la narcose, diminutions dont l'importance est voisine dans le cas des deux mélanges.

Des investigations du même ordre, vis-à-vis de l'intoxication aigüe provoquée par l'éthanol, nous ont conduit à faire les mêmes constatations : l'extrait butanolique d'Artichaut et le mélange quaternaire des acides organiques apportent une protection identique, la diminution de la DL 50 de l'éthanol administré par voie intrapéritonéale étant très voisine.

Ces résultats attirent l'attention sur les phénomènes de synergie dont il est si fréquemment question dans le langage des pharmacognosistes. On en trouve ici une démonstration spectaculaire.

Si trois des quatre acides organiques du mélange quaternaire

(acides malique, succinique et citrique) semblent pratiquement inactifs par eux-mêmes aux doses indiquées, leur mélange révèle déjà une certaine activité. Quant au mélange quaternaire obtenu par addition d'acide hydroxyméthylacrylique, il renforce à son tour les propriétés cholérètiques de la cynarine.

Ainsi, un mélange artificiel constitué des quatre acides suivants : acides citrique, malique, succinique et hydroxyméthylacrylique à parties égales, est capable de reproduire, sur les tests que nous avons choisi, les grandes activités hépatorénales que l'on reconnaît à l'Artichaut, à l'exclusion toutefois des effets cholérètiques dûs essentiellement à la cynarine.

Sans vouloir prononcer le mot de "principe actif", on peut dire que l'acide hydroxyméthylacrylique semble prendre une part importante dans l'activité de cette plante. La présence de cet acide dans les extraits d'Artichaut dépourvus de cynarine et de composés polyphénoliques permet donc bien d'expliquer leur activité hépatorénale, activité qui est d'ailleurs potentialisée dans ce cas par les autres acides organiques.

Dans la plante entière, l'acide hydroxyméthylacrylique est potentialisé par la cynarine et les polyphénols ainsi que les autres acides organiques. Cet acide nous paraît toutefois n'être qu'une pièce de "touche du système" et montre par ailleurs tout l'intérêt que l'on doit porter aux "blocs acides" dans le règne végétal.

# B I B L I O G R A P H I E


ALCOCK N.W., 1965. - A simple procedure for the extraction and esterification of some organic acids. Anal. Biochem., II, 335-341.

ARNOW E.L., 1937. - Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine - thyrosine mixtures. J. Biol. Chem., 118, 531-537.

ASAHINA Y., ASANO J., TANASE Y. et UENO Y., 1936. - Uber das Gentiopikrin (I. Mitteil). Chem. Ber., Dtsch, 69, 771-779.

ATHERINOS A.E., EL-KHOLYEL SAYED I., SOLIMAN G., 1962. - Chemical investigation of *Cynara scolymus* L. Part 1°. The steroids of the receptacles and leaves. J. Chem. Soc., London, 20, 1700-1704.

BALANSARD J., 1951. - Mise en évidence de l'acide glycolique chez diverses drogues utilisées comme diurètiques. Médecine tropicale, n° 4, 638-639.

BALANSARD J., 1952. - Les principes actifs diurètiques hépato-rénaux : acides glycolique et glycérique. Produits pharmaceutiques, 7, 456-458.

BALANSARD J. et BERNARD P., 1950. - Note pratique de chimie végétale. Médecine tropicale, n° 6, 941-1023.

BALANSARD J. et BERNARD P., 1952. - Recherches des acides organiques fixes dans quelques drogues végétales. Bull. Soc. Pharm., Marseille, n° 2, 28-32.

BERNATH P., SINGER T.P., 1962. - Succinic dehydrogenase. In COLOWICK S.P et KAPLAN N.O., Methods in Enzymology, Academic Press. Ed., New-York, vol. V, 597-614.

BEROZA M., 1963. - Agricult. and Food Chemistry, 11, 51.

BEZANGER-BEAUQUESNE L., 1967. - Les principes amers d'origine végétale. Revue française de la pharmacie, t. 2, n° 2, 33-45.

BOGAERT J.P., MORTIER F., DELAVEAU P., JOUANY J.M. et PELT J.M., 1972. - Intérêt des déterminations par voie enzymatique de certains acides alcools dans les drogues végétales. Bull. Soc. Pharm., Nancy, 94, 11-16.

BOUCARD M., LAUBENHEIMER B., 1966. - Action du nébulisat de fumeterre sur le débit biliaire. Thérapie, 21, 903-911.

BREL J., 1930. - L'Artichaut, Amédée Legrand. Ed., Paris.

BRUNNEL A., 1952. - Traité pratique de chimie végétale, 4, 190.

BULEN W.A., VARNER J.E. et BURRELL R.C., 1952. - Separation of organic acids from plant tissus : chromatographic technic. Anal. Chem., 24, 187-190.

CAMPESE V.M., SIRO-BRIGIANI G., 1971. - Azione coleretica dell'acido etacrinico nel ratto., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., n° 1, 22-23.

CANVIN D.T., 1965. - Analysis of som organic acids by gas-liquid chromatography. Canad. J. Biochem., 43, 1281-1287.

CARLES J., ALQUIER-BOUFFARD A., 1965. - De quelques perfectionnements pour la chromatographie sur colonne des acides organiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1519-1521.

CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMAIN M., WAITZ R., 1931. - L'action cholérètique du *Cynara scolymus*. C. r. Soc. Biol., 108, 1020-1022.

CHOMEL P.H.B., 1761. - In "Abrégé de l'histoire usuelle des plantes", Paris, (cité par ROCHIETTA).

CORBELLA A., GARIBOLDI P., JOMMI G., SAMEK Z., HOLUB M., DROZDZ B., BLOOSZYK E., 1972. - Absolute stereochemistry of cynaropicrin and related guaianolides. J. Chem. Soc. Chem. Comm., 7, 386-387.

DALGLIESH C.E., HORNING E.C., HORNING M.G., KNOX K.L., YAGER K., 1966. - A Gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occuring in urine or tissues extracts. Biochem. J., IOI, 792-810.

DAVIES D.D., GIOVANELLI J., APREES T., 1964. - Plant biochemistry. Blackwell Scientific publications. Ed., Oxford, 381-385.

DENIGES G., CHELLE L., LABAT A., 1930. - Précis de chimie analytique. Maloine. Ed., Paris, 236-238.

DONALSON K.O., TULANE V.J. et MARSHALL L.M., 1952. - Automatically increasing solvent polarity in chromatography. Anal. Chem., 24, 185-187.

DORIGO P. et FASSINA G., 1970. - Inhibitory effect of cynarine on free fatty acid mobilization. Pharmacol. Res. Comm., G.B., 2, 109-115.

DRANIK L.I., CHERNOBAI V.T., 1966. - "New flavonoid isolated from leaves of *Cynara scolymus*". Khim. Prirodn-Soedin. Akad-Nauk., 2, 16-20.

DUQUENOIS P., 1957. - Sur l'acide caféique et ses esters,(acide chlorogénique, etc.) considérés comme antibactériens naturels d'origine végétale. Bull. Acad. Nat. Méd., 141, 71-74.

ECK M., DESBORDES J., 1934. - Intérêt de la mesure du pouvoir cholestérolitique du sérum pour l'étude du métabolisme du cholestérol. C. r. Soc. Biol., 117, 422-431.

ECK M., DESBORDES J., 1934. - Sur l'hypercholestérinémie exogène et andogène du lapin. Influence de la stimulation hépatique. C. r. Soc. Biol., 117, 681-683.

ECK M., DESBORDES J., 1934. - Influence de l'âge sur les variations de la cholestérinémie et du pouvoir cholestérolitique. C. r. Soc. Biol., 117, 498-501.

EDGARD-ROSA G., 1928. - La nature, Fr.

EDGARD-ROSA G., 1934. - D'un principe actif du *Cynara scolymus* L. Gaz. Hôp., n° 21, 373-374.

ESTES F.L., BACHMANN R.C., 1966. - Gas chromatographic determination of pyruvic and lactic acids and Krebs cycle components : esterification and recovery. Anal. Chem., 38, 1178-1182.

FRUSHTORFER W., 1954. - "Zür Kenntnis der triterpenalkohole Taraxastérol und β. Taraxastérol". Chem. Ber., Dtsch., 87, 423-435.

GARROS M., 1934. - Les cholagogues. Thèse Doct. Univ. Pharm., Toulouse.

GLOMBITZA K.W., 1970. - Antinikrobelle inhaltsstoffe in algen : 2. Mitt das Vorkommen von akrylsäure in verschiedenen meersealgen. Planta Medica, 18, 210-221.

GONZALES A.G., MARRERO B.G., BRETON J.L., 1970. - Terpenoides de las compuestas X : Estructura de la Grosshemina, Lipidiol et isolipidiol Lactonas de la A. Lipii D.C. i su possible estereo quimica., n° 9-10, 799-813.

GRIGNARD V., 1945. - Traité de chimie organique, Masson et Cie. Ed., Paris, t. XI, fasc. 1, 371.

HOEPFNER W., 1932. - Zwei neue Reaktionen zür Kaesaür und Chlorogensaüre vorlaüfige. Mitteilung. aus dem gebiete der Koffee chemie, 56, 991.

HOHORST H-J., 1963. - L. (+) - lactate determination with lactic dehydrogenase and D P N. In BERGMEYER H.U. : Methods of enzymatic analysis, Academic Press. Ed., New-York and London, 266-270.

HOHORST H-J., 1963. - L. (-) - Malate determination with malic dehydrogenase and D P N. In BERGMEYER H.U. : Methods of enzymatic analysis, Academic Press. Ed., New-York and London, 328-332.

HORII Z.I., MAKITA M., TAMURA Y., 1965. - Gas-liquid chromatographic separation of acids of Krebs cycle as trimethylsilyl derivates. Chem. & Ind., 34, 1494.

HUMMEL J.P., 1949. - The fluorometric determination of malic acid. J. Bio. Chem., 180, 1225-1228.

ISHERWOOD F.A., 1946. - The determination and isolation of the organic acids in fruit . Biochem. J., 40, 688-695.

JOLCHINE G., 1956. - Les acides organiques des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger. Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 481-493.

McKEOWN G.G. et READ S.I., 1965. - Esterification and gas chromatography of some acids of the tricarboxylic acid cycle. Anal. Chem., 37, 1780-1782.

KIRCHNER J.G., 1967. - Thin-layer chromatography. In SPERRY E. et WEISSBERGER A., technic of organic chemistry, John WILEY et SONS. Ed., New-York et London, vol. XII, 436-437.

KNAPPE E. et PETERI O., 1962. - Dünnschichtchromatogratographie der Dicarbonsaüren. I. Mitteilung. Trennungen in der Homologen reihe von oxal-bis Sebausaüre. Z. Anal. Chem., 188, 184-189.

KRITCHEVSKY D., KIRK M.R., 1952. - Detection of steroids in paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys., 35, 346-351.

KUKSIS A., VISHWAKARMA P., 1963. - Simultaneous determination of Krebs cycle acids by gas-chromatography liquid. Canad. J. Biochem. Physiolog., 41, 2353-2362.

LEBEAU P. et COURTOIS G., 1938. - Traité de pharmacie chimique, Masson et Cie. Ed., Paris, t. I, 1014.

LEGRAND G., 1948. - Sur la présence d'une orthodiphénolase accompagnée d'un phénol dans l'Artichaut. C. r. Acad. Sci., Paris, 227, 600-601.

McLENNAN D.H., BEERVERS H., HARLEY J.L., 1963. - "Compartmentation of acids in plant tissues". Biochem. J., 89, 316-327.

LOEPER M., LEMAIRE A., DANY H., 1932. - La méthode stalagmonétique dans l'étude de certains cholérètiques. Progrès Méd., 2, 1450-1455.

LUKE H.H., FREEMANN T.E., KIER L.B., 1963. - Identification of the methyl esters of the stable Krebs cycle acids by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 35, 1916-1918.

MALZIAK P., SALSAC L., 1965. - Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides organiques végétaux. Phytochemistry, 4, 693-703.

MASQUELIER J., MICHAUD J., 1956. - Note sur les constituants polyphénoliques du *Cynara scolymus* L. Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 95, 65-67.

MELQUIOND-FOURNIER B., 1971. - Sur le dosage des acides organiques chez les végétaux supérieurs. Thèse Univ. Pharm., Marseille.

MESNARD P. et DEVAUX G., 1964. - Nouvelle méthode de dosage colorimétrique de l'acide quinique et de ses esters naturels. Bull. Soc. Chim., Fr., n° 1, 43-47.

MEYER K. H., 1919. - Uber Kupplung von diazoverbindungrn mit Kohlenwasserstossen. Ber. Chem. Dtsch., 52 B, 1468.

MICHAUD J., MASQUELIER J., 1957. - Les constituants polyphénoliques du *Cynara scolymus* L., étude du scolymoside. Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 96, 103-105.

MICHAUD J., 1964. - Contributions à l'étude chimique et analytique de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse, Doct. Pharm. (diplôme d'Etat), Bordeaux.

MICHAUD J., 1967. - Nouvel extrait d'Artichaut. Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 106, 181-190.

MONTVILLE F., 1933. - Le *Cynara scolymus* (Artichaut cultivé) en thérapeutique. Thèse Méd., Paris.

MORTIER F., 1972. - De l'intérêt thérapeutique de certains acides organiques aliphatiques constituants de diverses drogues à réputation hépatorénale et en particulier de *Cynara scolymus* L., Thèse Doct. Etat Pharm., Nancy.

MOYSE A. et JOLCHINE G., 1956. - Les variations quantitatives des acides organiques des feuilles de *Bryophyllum* à l'obscurité et à la lumière, en fonction de la tension partielle d'oxygène. Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 761-784.

MIYAZAKI S., SUHARA Y., KOBAYASHI T., 1969. - Separation of aliphatic dibasic acids by thin-layer chromatography. J. Chrom., 39, 88-90.

MYERS W.F. et KUEN-YEN HUANG, 1969. - Thin-layer chromatography of citric acid cycle compounds. In LOWENSTEIN J. M., Methods in enzymology, vol. XIII, Academic Press. Ed., New-York and London, 431-434.

NYGAARD P., 1967. - Two-way separation of carboxylic acids by thin-layer electrophoresis and chromatography. J. Chrom., 30, 240-243.

PANIZZI L. et SCARPATI M.L., 1954. - Isolamento e costituzione del principio attivo del carciofo. Gazz. Chim. Ital., 84, 806-815.

PANIZZI L. et SCARPATI M.L., 1954. - Constitution of cynarine , the active principle of the artichoke. Nature, 174, 1062.

PANKOW H.J., ANTERHOFF H., 1970. - Zür Kenntnis der Reacktion von apfelsaüre mit Chromotropsaüre. Archiv. der Pharmazie, 303, 402-404.

PARIS R.R. et MOYSE H., 1971. - Précis de matière médicale, t. III, Masson et Cie. Ed., Paris, 445-450.

PASSERA C., PEDROTTI A., FERRARI G., 1964. - Thin-layer chromatography of carboxylic acids and keto acids of biological interest. J. Chrom., 14, 289-291.

PELT J.M., 1965. - "La place des drogues et principes d'origine végétale dans la thérapeutique". II - L'utilisation des drogues végétales sous formes galéniques (évolution quantitative et qualitative). Bull. Soc. Pharm., Nancy, 64, 20-44.

PEPKOWITZ L.P., GILBERT S.G., SHIVE J.W., 1944. - The importance of oxygen in the nutrient substrate for plants - organic acid. Soil Sci., 58, 295-303.

PESEZ M., POIRIER P. et BARTOS J., 1966. - Pratique de l'analyse organique colorimétrique, Masson et Cie. Ed., Paris, 159.

PETROWITZ H.J., PASTUSKA G., 1962. - Uber die Kieselgelschichtchromatographic gesattigter aliphatischer dicarbonsaüren. J. Chrom., 7, 128-130.

PHAN CHON-TON, 1971. - L'éthylène : métabolisme et activité métabolique. Masson et Cie. Ed., Paris, 63-66.

PICARD R., 1935. - Etude expérimentale et clinique d'un principe acti-cristallisé du *Cynara scolymus* (Artichaut cultivé). Thèse Doct. Méd., Paris.

POLIKOFF R., LIEBERMAN H., COCHRAN K.W. et PASCALE A.N., 1965. - Antimicrobial agents and chemotherapy. Amer. Soc. for Microbiology. Ed., 561.

PRESIOZI P., LOSCALZO B., 1957. - Valutazione sperimentale dell'ac. 1, 4 dicaffeilchinico principio attivo del carciofo. Archiv. Ital. Sci. farm., 3° série, 7, 249-296.

PRESIOZI P., LOSCALZO B., 1957. - Ricerche farmacodinamiche sul vero principio attivo del carciofo *Cynara scolymus* (acido-1,4- dicaffeilchinico) : azione sui valori colesteremii e sull' ipercolesterolemia da triton. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 33, 679-682.

RAVEUX R. et BOVE J., 1957. - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de $C_1$ à $C_6$ par chromatographie de partage sur colonne de silice. I.- Etude générale. Bull. Soc. Chim. Fr., 369-376.

RAVEUX R. et BOVE J., 1957. - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de $C_1$ à C6 par chromatographie sur colonne de silice. II.- Nouvelle technique proposée. Bull. Soc. Chim. Fr., 376-381.

RAVINA A., 1934. - L'action thérapeutique de la feuille d'Artichaut et de son principe cristallisé. Presse Méd., 42, 1299.

ROCHIETTA S., 1959. - Storia farmaceutica e terapeutica del carciofo (*Cynara scolymus* L.) dall' antichità ai giorni nostri. Minerva farm., Ital., 8 71-78.

ROSENTHAL R.W., SCHWARTZMAN L.H., GRECO N.P. et PROPER R., 1963. - Carboxylation of propargyl alcohol. J. Org. Chem., 28, 2835-2838.

SAMEK Z., HOLUB M., DROZDZ B., JOMMI G., CORBELLA A., GARIBOLDI P., 1971.- Sesquiterpenic lactones of the *Cynara scolymus* L. species. Tetrahedron letters, 50, 4775-4778.

SAMOCHOWIEC L., 1959. - Experimental atherosclerosis. XV. The effect of *Cynara scolymus* & *Cynara cardunculus* on the development of experimental atherosclerosis in white rats. Dissertationes Pharm., 11, 99-113.

SCARPATI M.L., ORIENTE G., 1957. - "Ricerca della cinarina nelle piante accanto ad altri caffeilderivati". Ann. Chim., Ital., 47, 155-162.

SCHWEPPE H., 1959. - In "Papier chromatographie in der Botanik". Springer Heidelberg. 82.

SCOTT R.W., 1955. - Chromatography of organic acids with nonesterifying solvents. Anal. Chem., 27, 367-369.

SIEBERT G., 1963. - Citrate and isocitrate determination with aconitase and isocitric dehydrogenase. In BERGMEYER H.U. : Methods of enzymatic analysis. Academic Press. Ed., New-York and London, 318-323.

SINGER T.P., BERNATH P. et LUSTY C.J., 1963. - Succinate. In BERGMEYER H.U. : Methods of enzymatic analysis. Academic Press. Ed., New-York and London, 340-345.

SOKOLOVA V.E., LYOUBARTSEVA L.A., VASILTCHENKO E.A., 1970. - L'influence de l'Artichaut (*Cynara scolymus*) sur certains aspects du métabolisme azoté chez les animaux. (en russe). Farmacologiya i toksikologiya, n° 3, 340-343.

STAHL E., 1969. - Thin-layer chromatography. Springer-verlag, Berlin, n° 175, 188.

STUTZ R.E. et BURRIS R.H., 1951. - Photosynthesis and metabolism of organic acids in higher plants. Plant Physiol., 26, 226-243.

SUCHY M., HEROUT V., SORM F., 1960. - On terpenes. CVI. On hydrogenation products of cynaropicrin, the bitter principle of Artichoke ( *Cynara scolymus* L.). Coll. Czechozlov. Chem. Comm., 25, 507-514.

SUCHY M., HEROUT V., SORM F., 1960. - On terpenes. CXVI. Structure of cynaropicrin. Coll. Czechozlov. Chem. Comm., 25, 2777-2782.

SWAIN T., 1953. - The Identification of coumarins and related compounds by filter-paper chromatography. Biochem. J., 53, 200-208.

TIXIER L., DE SEZE S., ECK M., 1934. - Nouvelle recherche sur l'action thérapeutique de la feuille d'Artichaut. Essai clinique expérimental d'un principe cristallisé. Bull. Mem. Soc. Thérapeut., série 15, 39, 108-125.

TIXIER L., DE SEZE S., 1939. - "Physiologie and therapeutic actions of *Cynara scolymus* (Artichoke)". Presse Méd., 47, 880-883.

TIXIER L., DE SEZE S., ECK M., 1937. - "Therapy of diseases caused by excess of cholesterol". Rev. Méd., 54, 204-222.

VANLERENBEGBERGUES H., GUERRIN F., BAR N., BEL C., 1963. - Secrétion de la bile par le foie, action de l'azide de sodium. C. r. Soc. Fr. Biol., 157, 1454-1455.

WILLIAMSON J.R. et CORKEY B.E., 1969. - Essays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. Succinate determination with succinate thiokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. In LOWENSTEIN J.M. : Methods in enzymology, vol. XIII, Academic Press. Ed., New-York and London, 458-453.

WITTING G., SCHOLLKOPF U., 1954. - Uber triphenyl-phosphinmethilene als olefinbildende reagenzien. Chem. Ber., Dtsch., 87, 1318-1330.